



**Die Identifizierung und Charakterisierung  
zweier bakterieller Riboflavintransporter  
und des Thiamintransporters der Spaltheefe  
*Schizosaccharomyces pombe***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin –  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christian Vogl  
aus Regen

Regensburg im Februar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am  
Tag der mündlichen Prüfung

12. Februar 2008  
10. April 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von

PD Dr. Jürgen Stolz

Prüfungsausschuss

Prof. Dr. Charlotte Förster, Vorsitzende  
PD Dr. Jürgen Stolz, 1. Prüfer  
Prof. Dr. Reinhard Sterner, 2. Prüfer  
Prof. Dr. Günter Hauska, 3. Prüfer

Veröffentlichungen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

Mansour, N.M., Sawhney, M., Tamang, D.G., Vogl, C., Saier, M.H. Jr. 2007. The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. FEBS J. **274**:612-29.

Vogl, C., Grill, S., Schilling, O., Stülke, J., Mack, M., Stolz, J. 2007. Characterization of riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **189**:7367-75.

Vogl, C., Klein, C.M., Batke, A.F., Schweingruber, E.M., Stolz, J. 2008. Characterization of Thi9, a novel thiamine (vitamin B<sub>1</sub>) transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. **283**:7379-89

Projektbeschreibung des Graduiertenkollegs GRK640 „Sensorische Photorezeptoren in natürlichen und artifiziellen Systemen“, Spektrum der Wissenschaft, Juli 2005



# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Vorwort	9
<b>I. Kapitel</b>	<b>Die Charakterisierung bakterieller Transportproteine für Riboflavin: YpaA aus <i>Bacillus subtilis</i> und RibM aus <i>Corynebacterium glutamicum</i></b>
<b>I.A.</b>	<b>Einleitung</b>
I.A.1.	Die Entdeckung von Riboflavin 12
I.A.2.	Die Struktur und Chemie von Riboflavin und Roseoflavin 12
I.A.3.	Der Stoffwechsel von Riboflavin 14
I.A.3.1.	Die Riboflavinbiosynthese 14
I.A.3.2.	Flavine als Regulatoren der Genexpression 17
I.A.3.3.	Der Transport von Flavinen 20
I.A.4.	Die Funktion von Flavinen 21
I.A.4.1.	Im Metabolismus 21
I.A.4.2.	In der DNA-Reparatur 22
I.A.4.3.	Bei der Wahrnehmung von Blaulicht 22
I.A.4.4.	Bei der Biolumineszenz 23
I.A.5.	Die Erforschung von Flavoproteinen 23
I.A.6.	Zielsetzung dieser Arbeit 24
<b>I.B.</b>	<b>Material und Methoden</b>
<b>I.B.1.</b>	<b>Material 25</b>
I.B.1.1.	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial 25
I.B.1.2.	Geräte 26
I.B.1.3.	Datenbanken, Internetdienste und Software 26
I.B.1.4.	Organismen 27
I.B.1.4.1.	<i>E. coli</i> Stämme 27
I.B.1.4.2.	<i>B. subtilis</i> Stämme 27
I.B.1.5.	Oligonukleotide 28
I.B.1.6.	Plasmide 29
I.B.1.6.1.	<i>E. coli</i> Vektoren 29
I.B.1.6.2.	<i>B. subtilis</i> Vektoren 29
I.B.1.7.	Medien, Puffer und Lösungen 31
I.B.1.7.1.	Medien 31
I.B.1.7.2.	Puffer und Lösungen 31
<b>I.B.2.</b>	<b>Methoden 33</b>
I.B.2.1.	Molekularbiologische Methoden 33
I.B.2.1.1.	Standardmethoden 33
I.B.2.1.2.	Plasmide zur Untersuchung der Topologie von YpaA 33
I.B.2.1.3.	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> 33
I.B.2.1.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) 34
I.B.2.1.5.	Subklonierung von blunt PCR-Produkten 34
I.B.2.1.6.	Kolonie-PCR 34
I.B.2.1.7.	STET-Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> 34
I.B.2.1.8.	Transformation von <i>B. subtilis</i> 34
I.B.2.1.9.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> 35

I.B.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	35
I.B.2.2.1.	Isolierung der Membranfraktion von <i>B. subtilis</i>	35
I.B.2.2.2.	Affinitätschromatographie epitopmarkierter Proteine mit Avidin, IgG-Sepharose, Ni-NTA Agarose und Protein A-Sepharose	36
I.B.2.2.3.	Proteinbestimmung nach Bradford	36
I.B.2.2.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse	37
I.B.2.2.5.	Analyse von Proteinbanden im SDS-Gel mittels Massenspektroskopie	37
I.B.2.2.6.	Analyse der Fusionsproteine YpaAX-GFP, YpaAX-LacZ und YpaAX-PhoA	38
I.B.2.2.7.	Aufnahmetests mit [ <sup>14</sup> C]Riboflavin und [ <sup>14</sup> C]Fruktose	39
I.B.2.3.	Sonstige Methoden	39
I.B.2.3.1.	Anzuchtbedingungen und Dauerkulturen	39
I.B.2.3.2.	Wachstumstests	40
I.B.2.3.3.	Bestimmung der Konzentration von sezerniertem Riboflavin durch Fluoreszenzanalyse	40
I.B.2.3.4.	Nachweis von [ <sup>14</sup> C]Riboflavin durch Autoradiographie	40
<b>I.C.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>I.C.1.</b>	<b>Die Charakterisierung des Riboflavintransporters YpaA aus <i>Bacillus subtilis</i></b>	
I.C.1.1.	<i>In silico</i> Analyse von YpaA, einem Mitglied der Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter (BART) Superfamilie	41
I.C.1.2.	YpaA vermittelt Riboflavintransport in <i>B. subtilis</i>	42
I.C.1.3.	Die Aufnahme von Riboflavin erfolgt nicht über ein neuartiges Phosphotransferasesystem	44
I.C.1.4.	Untersuchungen zur Regulation der Genexpression von <i>ypaA</i>	46
I.C.1.4.1.	Die Regulation durch Eisen	46
I.C.1.4.2.	Die Regulation durch Riboflavin	47
I.C.1.5.	Die Charakterisierung des YpaA-vermittelten Riboflavintransports	49
I.C.1.5.1.	Der Einfluss von Riboflavinanaloga	49
I.C.1.5.2.	Die Energieabhängigkeit des Riboflavintransports	50
I.C.1.6.	Die Membrantopologie von YpaA	51
<b>I.C.2.</b>	<b>Die Charakterisierung des Riboflavintransporters RibM aus <i>Corynebacterium glutamicum</i></b>	
I.C.2.1.	<i>In silico</i> Analyse von RibM	54
I.C.2.2.	RibM transportiert Riboflavin und vermittelt Sensitivität gegenüber Roseoflavin	54
I.C.2.3.	RibM ist ein Facilitator und spezifisch für Riboflavin	56
<b>I.C.3.</b>	<b>Anwendungen für bakterielle Riboflavintransporter</b>	
I.C.3.1.	Untersuchung zur Ausscheidung von Riboflavin in <i>B. subtilis</i>	58
I.C.3.2.	Versuche zur Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung von Flavoproteinen mit modifizierten Flavinen	59
I.C.3.2.1.	Co-Expression von <i>ribM</i> -3HA und Dodecin-6His in BL21(DE3)	60
I.C.3.2.2.	Die Expression von Dodecin steigert die Riboflavinaufnahme	60
I.C.3.2.3.	Der Einbau von Roseoflavin und [ <sup>14</sup> C]Riboflavin in Dodecin	61
I.C.3.2.4.	Die Isolierung der gebundenen Chromophoren	63
I.C.3.2.5.	Die Quantifizierung der Chromophore	64

<b>I.D.</b>	<b>Diskussion</b>	
I.D.1.	Die bakteriellen Riboflavintransporter YpaA und RibM	66
I.D.1.1.	Riboflavintransporter besitzen unterschiedliche Ursprünge	66
I.D.1.2.	YpaA und RibM besitzen unterschiedliche Transportmechanismen	68
I.D.1.3.	Die Substratspezifität von YpaA und RibM	70
I.D.1.4.	Der Export von Riboflavin	72
I.D.1.5.	Die Regulation der Genexpression von <i>ypaA</i>	73
I.D.1.6.	Mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen von YpaA	75
I.D.2.	Die Expression von Hybrid-Flavoproteinen mit nicht-natürlichen Liganden	77
<b>II. Kapitel</b>	<b>Die Charakterisierung des Thiamintransporters Thi9 aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i></b>	
<b>II.A.</b>	<b>Einleitung</b>	
II.A.1.	Von Beriberi zu Thiamin	80
II.A.2	Die Struktur und Chemie von Thiamin und Pyrithiamin	80
II.A.3.	Die Funktion von Thiamin im Stoffwechsel	81
II.A.4.	Der Stoffwechsel von Thiamin	82
II.A.4.1.	Die Thiaminbiosynthese	83
II.A.4.1.1.	Die Synthese der Pyrimidineinheit	83
II.A.4.1.2.	Die Synthese der Thiazoleinheit	84
II.A.4.1.3.	Die Bildung von Thiamindiphosphat	85
II.A.4.2.	Der Transport von Thiamin	87
II.A.4.3.	Thiamin reguliert die Expression bestimmter Gene	90
II.A.5.	Zielsetzung dieser Arbeit	92
		96
<b>II.B.</b>	<b>Material und Methoden</b>	
<b>II.B.1.</b>	<b>Material</b>	98
II.B.1.1.	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	98
II.B.1.2.	Geräte	98
II.B.1.3.	Datenbanken, Internetdienste und Software	98
II.B.1.4.	Organismen	98
II.B.1.4.1.	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	98
II.B.1.4.2.	<i>S. pombe</i> Stämme	98
II.B.1.5.	Plasmide	99
II.B.1.6.	Medien, Puffer und Lösungen	99
II.B.1.6.1.	Medien für <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	99
II.B.1.6.2.	Puffer und Lösungen	100
<b>II.B.2.</b>	<b>Methoden</b>	101
II.B.2.1.	Molekularbiologische Methoden	101
II.B.2.1.1.	RNA Isolierung	101
II.B.2.1.2.	Northern Blot Analyse	101
II.B.2.1.3.	Sondenherstellung und Hybridisierung	101
II.B.2.2.	Biochemische Methoden – Aufnahmetest mit [ <sup>3</sup> H]Thiamin	102
II.B.2.3.	Sontige Methoden – Wachstumstests	102

<b>II.C.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
II.C.1.	SPAC9.10 supprimiert den Wachstumsdefekt einer thiamin-auxotrophen Bäckerhefemutante	103
II.C.2.	Thi9 besitzt keine Ähnlichkeit zu bekannten Thiamintransportern	103
II.C.3.	Thi9 ist ein Membranprotein, das den Import von Pyrithiamin vermittelt	103
II.C.4.	Thi9 transportiert Thiamin	105
II.C.5.	Kinetische Charakterisierung von Thi9	107
II.C.6.	Der Pyridoxintransporter Bsu1 transportiert ebenfalls Thiamin	108
II.C.7.	Die Expression von <i>thi9</i> <sup>+</sup> wird durch Thiamin reguliert	110
<b>II.D.</b>	<b>Diskussion</b>	
II.D.1.	Der Verlust der Thiaminbiosynthese als evolutionärer Vorteil	116
II.D.2.	Transportsysteme für Thiamin entwickelten sich mehrmals unabhängig	117
II.D.3.	Thiamintransport in <i>S. pombe</i>	119
II.D.4.	Die Regulation der Genexpression durch Thiamindiphosphat	120
II.D.5.	Ein <i>thi9Δ</i> Stamm verändert die thiaminabhängige Genexpression	122
II.D.6.	Ausblick	123
<b>III.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	124
<b>IV.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	125
<b>V.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	138
<b>VI.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	140
<b>VII.</b>	<b>Danksagung</b>	141
<b>VIII.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	142

## Vorwort – Eine Einführung in die Vitamine

Per Definition sind Vitamine organische Verbindungen, die essentielle Nahrungsbestandteile eines Organismus bilden, da dieser entweder die Fähigkeit zu deren Biosynthese verloren hat oder nicht die physiologisch nötige Menge herstellen kann. Obwohl bereits geringe Mengen ausreichen, um eine normale Entwicklung zu gewährleisten, müssen sie fester Bestandteil der täglichen Ernährung sein. Eine Unterversorgung an Vitaminen kann zu ausgeprägten Mangelsymptomen und zur Erkrankung führen.

Eine systematische Einteilung der insgesamt – für den Menschen notwendigen – 13 Vitamine ist schwierig, da sie völlig unterschiedlichen Stoffklassen angehören und im Organismus unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Deshalb wurde die schon während ihrer Erforschung übliche Unterscheidung zwischen fettlöslich und wasserlöslich beibehalten. Zu den fettlöslichen Vitaminen zählen die Vitamine A (Retinol,  $\beta$ -Carotin), D (Calciferol), E (Tocopherol, Tocotrien) und K (Phylloquinon, Menaquinon). Die Gruppe der wasserlöslichen Vitamine setzt sich zusammen aus den Vitaminen B<sub>1</sub> (Thiamin), B<sub>2</sub> (Riboflavin), B<sub>6</sub> (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin und ihre Phosphate), B<sub>12</sub> (Cobalamin), H (Biotin), C (Ascorbinsäure), Folsäure, Niacin (Nicotinsäure, Nicotinamid, früher auch Vitamin B<sub>3</sub>) und Pantothensäure (früher Vitamin B<sub>5</sub>).

Die Erforschung der Vitamine geht auf Sir Frederick Gowland Hopkins und seine legendären Fütterungsexperimente Anfang des 20. Jahrhunderts zurück, als er noch Lecturer für Biochemie am Emmanuel College in Cambridge war. Ratten, denen er nur ein definiertes Gemisch aus Kasein, Schmalz, Rohrzucker, Stärke und Mineralien zu fressen gab, verloren sehr rasch an Gewicht und zeigten unterschiedlichste Krankheitssymptome. Die zusätzliche Gabe einer kleinen Menge Milch reichte aus, damit die Kontrollgruppe sich normal entwickelte und die erkrankten Tiere sich wieder erholten. Demnach mussten in der Milch ein oder mehrere essentielle Wachstumsfaktoren enthalten sein, die als „bios“ bezeichnet wurden. Der polnische Biochemiker Casimir Funk arbeitete an der Isolierung einer Substanz, die für die Mangelerkrankung Beriberi verantwortlich war. Da sie eine Aminogruppe besaß, gab er ihr 1912 den Namen „Vitamin“ (von lat. *vita* = Leben), der sehr bald als generelle Bezeichnung dieser – noch unbekannten – Wachstumsfaktoren verwendet wurde, auch wenn die meisten nicht über eine Aminofunktion verfügen. Die Isolierung und Identifizierung der Vitamine war eine immense Herausforderung, da sie nur in minimalen Mengen in den jeweiligen Nahrungsmitteln, Geweben oder Körperflüssigkeiten vorhanden waren. Ein beeindruckendes Beispiel dafür ist die Isolierung von Biotin durch Kögl und Tönnis im Jahre 1936 (131). Es gelang ihnen, in einer 16-stufigen Reinigung aus 250 kg getrocknetem Eidotter insgesamt 1,1 mg Biotin zu isolieren, was einer 320.000fachen Anreicherung und einer Gesamtausbeute von 1,8% entsprach.

Der Nachweis der Vitamine erfolgte zunächst auf der Grundlage von Fütterungsexperimenten, und zwar mit Tieren, bei denen durch wochenlange Diät ein künstlicher Vitaminmangel hervorgerufen

worden war. Eine von B. C. P. Jansen und W. F. Donath aus Reishüllen extrahierte Substanz, die später als Vitamin B<sub>1</sub> oder Thiamin identifiziert wurde, war in der Lage, an Beriberi erkrankte Tauben zu heilen. Diese Fähigkeit ließ erkennen, dass es sich bei den Vitaminen um nichts anderes als die von Hopkins postulierten, aber noch nicht identifizierten Wachstumsfaktoren namens „bios“ handelte. Als man feststellte, dass manche Bakterien und Hefen auxotroph für bestimmte Vitamine waren, ersetzten sie nach und nach die Tierversuche. Ihr definierter Vitaminbedarf sowie das sensitive und schnelle Wachstum erlaubten einen sehr präzisen und raschen Nachweis von kleinsten Mengen des jeweiligen Vitamins. Der Biochemiker R. J. Williams erkannte als erster das Potential der Mikroorganismen und leistete Pionierarbeit bei der Etablierung dieser Wachstumstests. In einer kritischen Abhandlung stellte er die Bedeutung und Vorteile der „yeast route“ heraus. Seiner Meinung nach hätten die meisten Vitamine sehr viel schneller identifiziert werden können, wenn die Vitaminforschung einen anderen Weg gegangen wäre:

*„Because testing with yeast, though not without pitfalls, is incomparably more rapid than testing with animals, it is reasonable to assume that progress would have been much more rapid using the „yeast route“ than it has been using animals as test organisms. (...) if the hypothetical vitamin chemists (...) had broadened the scope of their investigations and had investigated the nutrition not only of yeasts but of other non-pathogenic microorganisms (...), they would have found **all** the members of the „vitamin B complex“ which are known. ...“ (279)*

Auch heute gehören Wachstumstests aufgrund ihrer hohen Sensitivität zu den Standardmethoden, um Vitamine zu quantifizieren. Damit der Wachstumsdefekt, der bei Vitaminmangel auftritt, durch das von außen zugegebene Vitamin komplementiert werden kann, müssen die auxotrophen Organismen über spezifische Transportmechanismen verfügen, um die Aufnahme des Wachstumsfaktors zu ermöglichen. Die Identifizierung von drei dieser Transportsysteme wird in dieser Arbeit geschildert: die bakteriellen Transportproteine für Riboflavin YpaA aus *Bacillus subtilis* und RibM aus *Corynebacterium glutamicum* sowie der Thiamintransporter Thi9 aus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*.

# I. Kapitel

---

Die Charakterisierung bakterieller  
Transportproteine für Riboflavin:  
YpaA aus *Bacillus subtilis* und  
RibM aus *Corynebacterium glutamicum*

---

# **I. Einleitung**

## **I.A.1. Die Entdeckung von Riboflavin**

Der englische Chemiker A. Wynter Blyth beschrieb im Jahre 1879 die Zusammensetzung von Kuhmilch (19). Einer der Bestandteile war ein gelber Farbstoff, den er Lactochrom (von lat. *lac* = Milch, griech. *chromos* = Farbe) nannte. Diese Substanz geriet nach ihrer ersten Erwähnung für nahezu ein halbes Jahrhundert in Vergessenheit und ihre intensive Erforschung begann erst Anfang der 1930er Jahre, als aus vielen verschiedenen organischen Materialien ähnliche gelbe, grünlich-fluoreszierende Substanzen isoliert wurden und ihrer Herkunft entsprechend Lactoflavin, Ovoflavin, Hepatoflavin oder Uroflavin bezeichnet wurden. Otto Warburg, der gerade an der Entschlüsselung der Zellatmung arbeitete, beschrieb 1932 zusammen mit Walter Christian ein „Yellow Enzyme“, das sie aus einem wässrigen Hefeextrakt isolierten (275). Während des darauf folgenden Jahres trennten sie das Enzym in eine Protein- und eine Farbstoffkomponente, von denen keine die Enzymaktivität des Yellow Enzyme besaß (274). Nur wenn beide Fraktionen gemischt wurden, bildete sich das Holoenzym erneut mit seiner vollen Funktionalität zurück. Dies ließ darauf schließen, dass die gelbe Substanz unerlässlich für die katalytische Aktivität bestimmter Enzyme war. Durch weitere intensive Forschung wurde sehr bald klar, dass es sich bei allen isolierten Farbstoffen um ein und dieselbe Verbindung handelte. Nachdem ihre Struktur durch die Arbeiten von Richard Kuhn und Paul Karrer sowie ihrer Mitarbeiter aufgeklärt werden konnte, wurde die Substanz 1937 offiziell als Riboflavin bezeichnet. In Experimenten mit Ratten konnte nachgewiesen werden, dass bereits kleinste Mengen das Wachstum förderten, also die Eigenschaften eines Vitamins besaßen. Als zweites isoliertes Vitamin innerhalb der wasserlöslichen B-Gruppe erhielt es somit den Namen Vitamin B<sub>2</sub>.

## **I.A.2. Die Struktur und Chemie von Riboflavin und Roseoflavin**

Riboflavin, dessen IUPAC-Bezeichnung 7,8-Dimethyl-10-(D-1'-ribityl)-isoalloxazin lautet, besteht aus zwei chemischen Struktureinheiten: einem Isoalloxazinring mit zwei Methylgruppen an Position 7 und 8, dessen konjugiertes  $\pi$ -System für die gelbe Farbe verantwortlich ist, und einer D-Ribityl-Seitenkette am N-10 Atom, wodurch es als Derivat eines Zuckeralkohols aufgefasst werden kann (Abb. 1.1). Durch Phosphorylierung der terminalen Hydroxygruppe des Riboflavins mithilfe von ATP entsteht Riboflavin-5'-phosphat, das auch als Flavinmononukleotid (FMN) bezeichnet wird, obwohl es sich wegen der fehlenden glykosidischen Bindung zwischen der Ribitylkette und dem Isoalloxazinring um kein echtes Nukleotid handelt. Die anschließende Adenylierung durch ein weiteres ATP ergibt Flavinadenindinukleotid (FAD). Die beiden Flavine FMN und FAD stellen die katalytisch aktiven Cofaktoren im Stoffwechsel dar (Abb. 1.1). Riboflavin ist sehr lichtempfindlich.



Die durch Sonnen- oder UV-Licht hervorgerufene Photolyse von Riboflavin läuft über cytotoxische Riboflavinradikale ab und erzeugt unter alkalischen Bedingungen Lumiflavin und im sauren oder neutralen Milieu Lumichrom (Abb. 1.2).

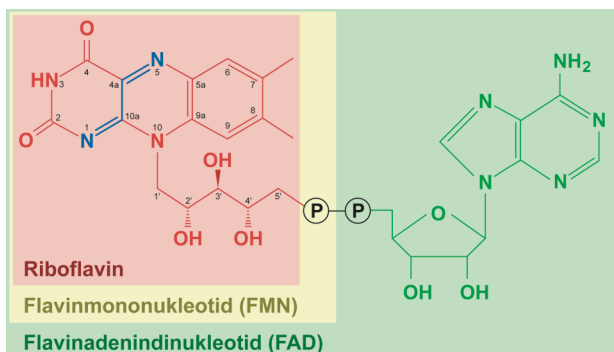


Abb. 1.1. Die Struktur der Flavine Riboflavin, Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD).

Es gibt eine Vielzahl von Riboflavinderivaten. Roseoflavin (7-Methyl-8-dimethylamino-10-(D-1'-ribityl)-isoalloxazin) unterscheidet sich beispielsweise von Riboflavin lediglich in der Position 8, in der die Methylgruppe gegen eine Dimethylaminogruppe ausgetauscht ist (Abb. 1.2 C). Das zusätzliche Elektronenpaar des Stickstoffs erweitert das konjugierte  $\pi$ -System des Isoalloxazins, was dem Analogon seine intensive rote Farbe verleiht. Neben der Absorption hat der Substituent auch Auswirkungen auf das Redoxverhalten. Das freie Elektronenpaar der Aminogruppe kann einerseits die Elektronendichte des Isoalloxazinrings und damit das Redoxpotential stark erhöhen. Das an ein Apoprotein gebundene Roseoflavin kann andererseits an der Aminofunktion protoniert werden, wodurch sich die Elektronendichte des  $\pi$ -Systems und damit das Redoxpotential des Flavins erniedrigen. Das geänderte Reduktionsvermögen führt zum Verlust der katalytischen Aktivität FMN- und FAD-abhängiger Enzyme, die an Redoxreaktionen beteiligt sind (40).

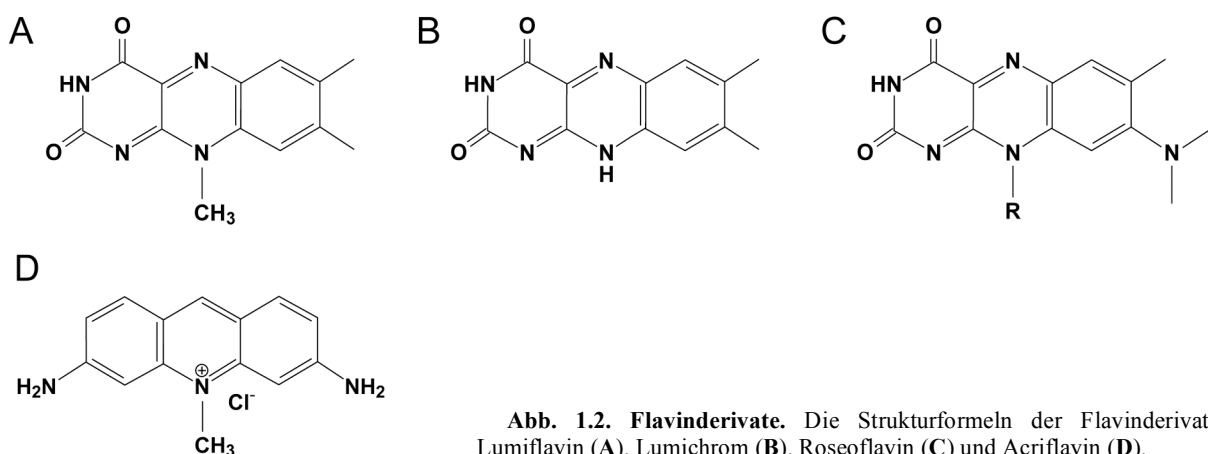


Abb. 1.2. Flavinderivate. Die Strukturformeln der Flavinderivate Lumiflavin (A), Lumichrom (B), Roseoflavin (C) und Acriflavin (D).

Bei Roseoflavin (RoF) handelt es sich nicht um ein chemisch synthetisiertes, sondern um ein natürliches Analogon von Riboflavin, welches durch die Enzyme der Riboflavinbiosynthese auch zu den phosphorylierten bzw. adenylierten Formen RoseoFMN (RoFMN) und RoseoFAD (RoFAD) umgewandelt werden kann (149). Es wird von dem Gram-positiven Bodenbakterium *Streptomyces davawensis* in hohen Mengen synthetisiert und besitzt eine antibakterielle Wirkung gegen andere Gram-positive Mikroorganismen (149, 159). Lediglich Vertreter der *Enterobacteriaceae*, wie *Escherichia coli*, scheinen aufgrund eines fehlenden Transportsystems für Riboflavin resistent gegen Roseoflavin zu sein (8, 230). Die Biosynthese von Roseoflavin ist noch nicht geklärt, verläuft aber vermutlich über Riboflavin als Intermediat (107, 149, 159).

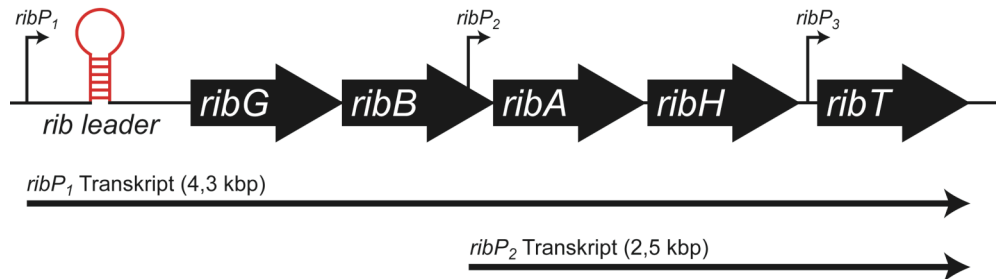
### **I.A.3. Der Stoffwechsel von Riboflavin**

#### **I.A.3.1. Die Riboflavinbiosynthese**

Riboflavin kann von Pflanzen, Hefen und vielen Mikroorganismen synthetisiert werden. Manche Pilze bilden es sogar in so großen Mengen, dass sie für die biotechnologische Herstellung von Riboflavin verwendet werden. Vertreter des Tierreiches decken ihren Bedarf an Riboflavin entweder durch die Nahrung oder sie beziehen es von den Bakterien in ihrem Verdauungstrakt. Ein spezifisches und intensiv untersuchtes Bindeprotein für Riboflavin (Riboflavin Carrier Protein, RCP) sichert die Versorgung des Fetus mit Vitamin B<sub>2</sub>, da Riboflavin und seine Coenzyme die Plazenta nicht passieren können. Der tägliche Bedarf eines Erwachsenen beträgt rund 1,5 mg und aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Riboflavin werden nur selten Vitaminmangelercheinungen beim Menschen beobachtet. Zur Herstellung von Vitaminpräparaten und Nahrungsergänzungsmitteln für Mensch und Tier wurde Riboflavin lange Zeit chemisch synthetisiert (130, 183). Die Entdeckung, dass die Hemiascomyceten *Ashbya gossypii* und *Candida famata* natürlicherweise Riboflavin in großen Mengen synthetisieren und in ihr Medium abgeben können, hat die chemische Synthese mehr und mehr durch biotechnologische Fermentation ersetzt, wodurch Produktionskosten, Abfall und Energie erheblich gesenkt werden konnten (261). Um die Syntheseleistung der Mikroorganismen zu steigern, wurde die bakterielle Riboflavinbiosynthese und ihre Regulation aufgrund der einfachen genetischen Modifikation deshalb zunächst in den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* intensiv erforscht (4, 5, 199).

Während die Biosynthesegene in *E. coli* einzeln im Genom vorliegen, sind sie in *B. subtilis* in einem 4,3 kbp großen Biosynthese-Operon (*rib* Operon) organisiert (Abb. 1.3). Es enthält die vier Biosynthesegene *ribG* (bifunktionelle Desaminase/Reduktase), *ribB* (Riboflavin Synthase,  $\alpha$ -Untereinheit), *ribA* (bifunktionelle GTP Cyclohydrolase II/DHBP Synthase) und *ribH* (Riboflavin Synthase,  $\beta$ -Untereinheit). *ribT* kodiert für ein Protein mit Ähnlichkeit zu Reduktasen und

N-Acetyltransferasen und wird nicht für die Biosynthese benötigt. Die Transkription der vier Gene unterliegt hauptsächlich der Kontrolle des *ribP<sub>1</sub>* Promotors sowie eines regulatorischen Elements (RFN-Element) im 5'-Bereich des Operons, der auch als *rib leader* bezeichnet wird. Die Transkription von *ribA* und *ribH* kann zusätzlich auch von einem zweiten Promotor *ribP<sub>2</sub>* ausgehen.



**Abb. 1.3. Die Organisation des *rib* Operons in *B. subtilis*.** *ribG* (bifunktionelle Desaminase/Reduktase), *ribB* ( $\alpha$ -Untereinheit der Riboflavin Synthase), *ribA* (bifunktionelle GTP Cyclohydrolase II/DHBP Synthase), *ribH* (Lumazin Synthase,  $\beta$ -Untereinheit der Riboflavin Synthase), *ribT* (putative Reduktase/N-Acetyltransferase, nicht für die Biosynthese benötigt). Die dünnen Pfeile markieren den Transkriptionsstart ausgehend von den Promotoren *ribP<sub>1</sub>*, *ribP<sub>2</sub>* und *ribP<sub>3</sub>*, die von der vegetativen Form der RNA Polymerase erkannt werden. Im 5'-Bereich des Operons, zwischen *ribP<sub>1</sub>* und *ribG* befindet sich die *rib leader* Sequenz mit RFN-Element (rot).

Im Folgenden werden die Reaktionen der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* kurz beschrieben, die auch in Abb. 1.4 dargestellt sind. Riboflavin wird aus den Molekülen GTP und Ribulose 5'-Phosphat gebildet, die auf getrennten Wegen prozessiert und schließlich miteinander verknüpft werden. Das bifunktionelle Enzym GTP Cyclohydrolase II/3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHBP) Synthase (RibA) katalysiert dabei den jeweils ersten Schritt beider Synthesewege. Unter Pyrophosphatabspaltung wird der Imidazolring von GTP [1] geöffnet und das Kohlenstoffatom C-8 als Formiat abgespalten. Der Pyrimidinring des Produkts (2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon 5'-Phosphat [2]) wird durch eine bifunktionelle Riboflavin-spezifische Desaminase/Reduktase (RibG) hydrolytisch desaminiert [3] und seine Ribitylseitenkette reduziert, wodurch 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1H,3H)-pyrimidinon 5'-Phosphat [4] entsteht, das anschließend dephosphoryliert wird [5]. Die DHBP Synthase-Aktivität des ersten Enzyms wandelt Ribulose 5'-Phosphat [6] in L-3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-Phosphat [7] um, aus dem durch die Lumazin Synthase (RibH,  $\beta$ -Untereinheit der Riboflavin Synthase) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin [8] entsteht. Den letzten Schritt übernimmt schließlich die Riboflavin Synthase (RibB,  $\alpha$ -Untereinheit), die mit der Lumazin Synthase einen 1-MDa großen Enzymkomplex bildet, dessen Struktur intensiv erforscht und aufgeklärt wurde (212). Er besteht aus 60  $\beta$ -Untereinheiten (ein Dodecamer aus Pentameren), die als icosaederförmiges Capsid ein Homotrimer von  $\alpha$ -Untereinheiten umschließen. Das erlaubt eine sehr schnelle und effiziente Übertragung des Produkts der Lumazin Synthase auf die aktiven Zentren der Riboflavin Synthase, was selbst bei niedrigen Substratkonzentrationen zu einer erstaunlich hohen Gesamt-Reaktionsgeschwindigkeit führt (120). Neben den beiden Enzymen ist auch die Reaktion selbst – eine ungewöhnliche Dismutation – sehr interessant. In ihr entstehen durch die



Übertragung einer C<sub>4</sub>-Einheit zwischen zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin [8] Riboflavin [9] und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion [5], das zugleich wieder das Substrat für die Lumazinsynthese darstellt. In der Gesamtstöchiometrie wird somit ein Molekül Riboflavin aus einem Molekül GTP und zwei Molekülen Ribulose 5'-Phosphat gebildet, wobei alle C-Atome des Xylenrings aus der Ribulose stammen. Riboflavin wird anschließend durch die Aktivität des bifunktionellen Enzyms Riboflavin Kinase/FAD Synthetase (RibC) zu den Cofaktoren FMN und FAD umgewandelt. RibC ist nicht Teil des *rib* Operons, ebenso wie RibR, eine kryptische Riboflavin Kinase, die unter normalen Bedingungen nicht exprimiert wird (137).

### I.A.3.2. Flavine als Regulatoren der Genexpression

Die Regulation der Riboflavinbiosynthese aufzuklären, war nicht nur von allgemeinem, sondern auch von industriellem Interesse, da dereprimierte *B. subtilis* Stämme zu einer gesteigerten Riboflavinbiosynthese fähig sein sollten. Nach Mutagenese war tatsächlich um manche Kolonien eine erhöhte Riboflavinausscheidung als gelblicher und im UV-Licht fluoreszierender Hof sichtbar (116), Abb. 1.5). Ursache dafür waren entweder *ribO* Mutationen, die im *rib leader* lokalisiert waren, oder Mutationen im *ribC* Locus, der für die bifunktionelle Riboflavin Kinase/FAD Synthetase kodiert (116, 127, 175). Daraus wurde gefolgert, dass das *rib* Operon durch ein Operator-Element (*ribO*) in *cis* und durch einen DNA- oder RNA-bindenden Repressor in *trans* reguliert wird (126).

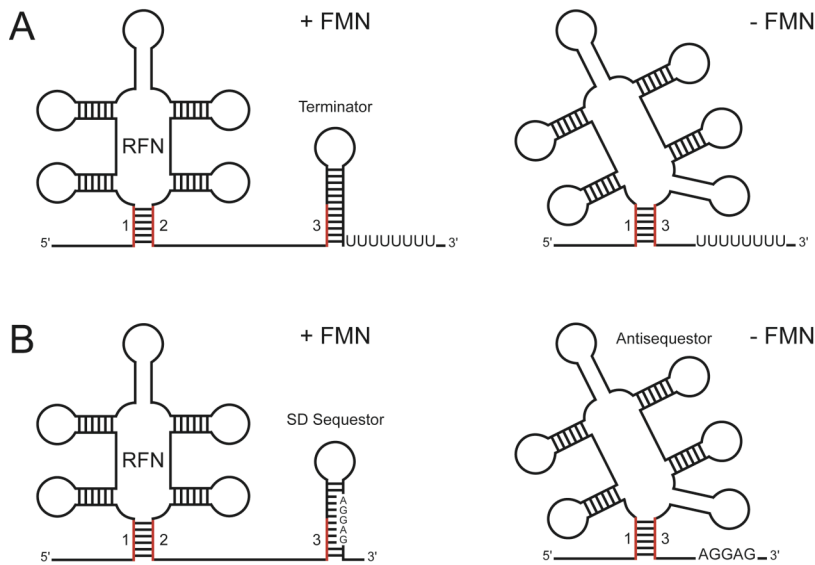
Gelfand et al. (68) untersuchten die *rib leader* Sequenzen von verschiedenen Gram-positiven Bakterien mithilfe vergleichender Computeranalysen und fanden, dass die Transkription dieser 5'-Bereiche ein konserviertes RNA-Element erzeugt. Da Mutationen in dieser Region (*ribO* Mutationen) die Expression des *rib* Operons beeinflussen, hat es eine entscheidende Funktion bei der Regulation der Biosynthese und wird daher als RFN (Riboflavin)-Element bezeichnet (68, 174, 263, 283). Aufgrund der Tatsache, dass Flavine direkt an RNA-Aptamere binden können, wurde ein Riboswitch-Mechanismus für dieses RFN-Element postuliert (Abb. 1.6, (3, 134, 197)). Riboswitches sind komplex gefaltete RNA-Domänen, die als Rezeptoren für bestimmte Metabolite, wie z.B. Thiamindiphosphat, Coenzym B<sub>12</sub>, S-Adenosylmethionin, Lysin und Purine dienen (264). Die durch die Bindung des Effektormoleküls herbeigeführte Strukturveränderung beeinflusst die Expression nachgeschalteter Gene – die meist am Stoffwechsel des jeweiligen Metaboliten beteiligt sind – indem die weitere Transkription durch einen



**Abb. 1.5. Der Verlust von *ribC* führt zur Überproduktion von Riboflavin in *B. subtilis*.** Im UV-Licht wird die gesteigerte Riboflavinbiosynthese eines Stammes mit einer *ribC1* Mutation (rechts), verglichen mit *B. subtilis* Wildtyp (links) deutlich.

Riboswitches sind komplex gefaltete RNA-Domänen, die als Rezeptoren für bestimmte Metabolite, wie z.B. Thiamindiphosphat, Coenzym B<sub>12</sub>, S-Adenosylmethionin, Lysin und Purine dienen (264). Die durch die Bindung des Effektormoleküls herbeigeführte Strukturveränderung beeinflusst die Expression nachgeschalteter Gene – die meist am Stoffwechsel des jeweiligen Metaboliten beteiligt sind – indem die weitere Transkription durch einen

Terminator gestoppt oder durch die Ausbildung eines Antiterminators fortgesetzt werden kann (Abb. 1.6 A). Die direkte Bindung von Flavinen und die damit verbundenen strukturellen Auswirkungen wurden auch für das RFN-Element nachgewiesen, das ein hoch-affiner ( $K_D < 10$  nM) und äußerst spezifischer Rezeptor für FMN ist. Obwohl sich FMN und Riboflavin nur in einer Phosphatgruppe unterscheiden, haben weder Riboflavin noch FAD, die 1000fach bzw. 100fach schlechter an das RFN-Element binden, einen reprimierenden Effekt auf das *rib* Operon (283).



**Abb. 1.6. Der postulierte Regulationsmechanismus durch ein RFN-Element.** (A) Die Bindung von FMN an das RFN-Element führt zur Ausbildung eines Terminators, der die Attenuation der Transkription zur Folge hat. Die Regulation auf Ebene der Transkription tritt hauptsächlich bei Operons auf. (B) Durch Bindung von FMN bildet sich eine Sequestor-Struktur, die die Shine-Dalgarno-Sequenz AGGAG maskiert und die Translationsinitiation blockiert. Durch diesen Mechanismus werden vor allem Einzelgene reguliert (nach Vitreschak et al. (263)).

Der Riboswitch-Mechanismus erklärt auch die fehlende Regulation der Riboflavinbiosynthese in *ribC* Mutanten. Das Genprodukt des mutierten *ribC* Allels besitzt nur 1% der Enzymaktivität des Wildtyp RibC Proteins (150). Dadurch bleibt die intrazelluläre Konzentration von FMN so gering, dass keine Bindung an das RFN-Element und damit keine Repression der Biosynthese stattfinden kann (Abb. 1.5). Die Riboflavin Kinase RibC spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation des *rib* Operons, indem es den Haupteffektor FMN synthetisiert, der seinerseits seine Biosynthese reprimiert. RibC übt dabei keinen direkten Effekt, etwa durch RNA-Bindung, auf das RFN-Element aus (150). Eine derartige Funktion als Repressor wird aber für RibR postuliert (82). Die N-terminale Domäne von RibR besitzt eine Aktivität als Riboflavin Kinase, die allerdings in *B. subtilis* Wildtyp nicht zur FMN-Synthese beiträgt, da *ribR* nicht der Regulation durch FMN unterliegt und unter normalen Bedingungen nicht oder nur gering exprimiert wird. Erst die Überexpression von *ribR* kann die Derepression des Biosyntheseoperons in *ribC* Mutanten aufheben (234-236). Obwohl für den C-terminalen Bereich, der keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen besitzt, in Yeast-3-Hybrid Assays eine direkte physikalische Interaktion von RibR mit dem RFN-Element nachgewiesen werden konnte, bleibt die genaue Funktion von RibR unklar (82).

Vitreschak et al. (263) führten Computeranalysen von Genomen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien durch, um weitere RFN-Elemente zu identifizieren und damit Gene, die am

Metabolismus von Riboflavin beteiligt sind. Neben den Elementen, die im 5'-Bereich von *rib* Operons liegen, fanden sie weitere RFN-Elemente, die einzelnen Genen vorgeschaltet sind, z.B. *ypaA* (u.a. in *B. subtilis*, *Lactococcus lactis*), *pnuX*<sup>1</sup> (*Corynebacterium glutamicum*), *impX* (*Fusobacterium nucleatum*, *Desulfotobacterium hafniense*) und *rfnT* (*Rhizobiaceae*). Die Expression einzelner Gene wird im Gegensatz zu den Operons meist auf Ebene der Translation gesteuert. Dieser Mechanismus wurde auch für die Regulation von *ypaA* vorgeschlagen. Dabei führt die Bindung von FMN zu einer Konformationsänderung des Riboswitch, wodurch die Shine-Dalgarno (SD) Sequenz verdeckt wird und für die Ribosomen unzugänglich ist (Abb. 1.6 B, (283)).

Im Vergleich zu *B. subtilis* sind die Gene für die Riboflavinbiosynthese in *E. coli* nicht in einem Operon organisiert. Außer *ribB*, das die 3,4-DHBP Synthase kodiert, enthalten sie auch kein RFN-Element im 5'-nicht-translatierten Bereich, sondern werden basal konstitutiv exprimiert und hauptsächlich von Genprodukten reguliert, die aufgrund von Superoxid-Stress entstehen (5, 123, 282).

Neben dieser Feedback-Inhibierung durch Flavine wird der Riboflavinmetabolismus in vielen Organismen auch durch die Eisenkonzentration im Medium beeinflusst. Eisen ist ein essentielles Spurenelement, das unter anderem auch in der Virulenz von pathogenen Bakterien eine wichtige Rolle spielt. Unter aeroben, oxidativen Bedingungen liegt Eisen in seiner oxidierten Form  $\text{Fe}^{3+}$  vor, das im Basischen unlösliches Eisenhydroxid bildet. Während  $\text{Fe}^{2+}$  über Transporter für divalente Metallionen direkt aufgenommen werden kann, ist dies für  $\text{Fe}^{3+}$  nicht möglich. Zudem ließe die niedrige Eisenkonzentration in Säugern aufgrund der Komplexbildung des Eisens durch Lactoferrin, Transferrin, Ferritin, Häm oder Hämproteine, kein bakterielles Wachstum zu. Deshalb haben Mikroorganismen Fähigkeiten entwickelt, die Eisenvorräte des Wirts zugänglich zu machen (198, 271). Da dafür jedoch spezifische Rezeptoren und Transportproteine für die einzelnen Eisencarrier notwendig sind, verfügen die meisten Bakterien, Eukaryoten und auch Pflanzen über spezielle Proteine, den Siderophores, die als Eisenchelatoren Eisen in seiner  $\text{Fe}^{3+}$ -Form komplexieren können (169). Die Ablösung des Eisens erfolgt entweder vor oder nach Aufnahme des Eisen-Siderophor-Komplexes unter anderem durch Reduktion des gebundenen  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ . Diese Reaktion wird von flavinabhängigen Reduktasen katalysiert, deren genauer Mechanismus noch nicht verstanden ist. Da sie keine Substratspezifität besitzen und reduzierte Flavine *per se* komplexiertes  $\text{Fe}^{3+}$  reduzieren können, scheinen die Reduktasen nicht direkt an der Reaktion beteiligt, sondern als eigentliche Flavinreduktasen nur für die Bereitstellung des Reduktionsmittels verantwortlich zu sein (224). Damit lässt sich sowohl die Induktion der Riboflavinbiosynthese als auch die ungewöhnlich hohe Ausscheidung der aufwendig synthetisierten Flavine erklären, die auf diese Weise die Mobilisierung des Eisens sicherstellen. Die gesteigerte Produktion von Riboflavin bei Eisenmangel konnte für die Bakterien *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni*, die flavinogene (Riboflavin-überproduzierende) Hefe *Pichia*

---

<sup>1</sup> Für *pnuX* und sein Genprodukt PnuX wurden aufgrund der Homologie zum putativen Riboflavintransporter RibM aus *Streptomyces davawensis* (71) die Bezeichnungen *ribM/RibM* vorgeschlagen, die in dieser Arbeit verwendet werden. Der Transporter aus *S. davawensis* wird als SdribM/SdRibM bezeichnet.

*guilliermondii*, sowie für Pflanzen nachgewiesen werden (23, 44, 269, 284). Ähnliche Phänomene sind für andere wasserlösliche Vitamine nicht bekannt.

### I.A.3.3. Der Transport von Flavinen

Obwohl die Fähigkeit zur Riboflavinbiosynthese in Pflanzen, Hefen und Bakterien nahezu ubiquitär ist, gibt es dennoch bakterielle Vertreter, z.B. *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* und manche *Lactobacillen*, für die Riboflavin ein essentieller Wachstumsfaktor ist (124). Um ihn aus dem umgebenden Medium aufnehmen zu können, müssen sie daher über einen geeigneten Transportmechanismus verfügen. Den ersten Beweis für bakteriellen Riboflavintransport erbrachten Cecchini et al. (35) in *B. subtilis* Zellen. Es handelt sich um einen hoch-affinen ( $K_m = 5\text{-}20\text{ nM}$ ), aktiven und energiegetriebenen Prozess, der durch Strukturanaloga inhibiert werden konnte. Die Aufnahme ist dabei eng mit der Phosphorylierung von Riboflavin gekoppelt, da unmittelbar nach seiner Aufnahme fast ausschließlich FMN und in geringerem Maße auch FAD, aber kein freies Riboflavin nachgewiesen werden konnte. Mithilfe von Membranpräparationen aus *B. subtilis* konnte eine Fraktion solubilisiert und teilweise aufgereinigt werden, die in der Lage ist, Riboflavin zu binden und die dieselben Eigenschaften hinsichtlich Kinetik und Inhibition besitzt wie intakte *B. subtilis* Zellen (34). Das verantwortliche Transportprotein blieb jedoch unbekannt. Mit der Identifizierung eines weiteren RFN-Elements im Genom von *B. subtilis*, das im 5'-nicht-translatierten Bereich des Gens *ypaA* lag, war ein Kandidat dafür gefunden. Mit seinen putativen fünf Transmembranhelices könnte das Protein YpaA den gesuchten Riboflavintransporter darstellen (68, 263, 283). Unterstützt wurde diese Vermutung dadurch, dass die zusätzliche Deletion von *ypaA* in einem riboflavinauxotrophen *B. subtilis* Stamm zu einem drastisch gesteigerten Riboflavinbedarf führte (125). Mit RibU aus *Lactococcus lactis* wurde ein bakterieller Riboflavintransporter charakterisiert, der ebenfalls der Kontrolle durch ein RFN-Element unterliegt und eine hohe Ähnlichkeit zu YpaA und Homologen aufweist (30). Transportprozesse für Riboflavin wurden auch in höheren Organismen wie Pilzen oder Säugern intensiv erforscht und charakterisiert (63, 64, 217) und darin enthaltene Referenzen). Allerdings ist der Riboflavintransporter Mch5 aus *S. cerevisiae* das einzige bislang bekannte eukaryotische Protein, das die Aufnahme des Vitamins vermittelt (210). Es gehört zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder (Mch1-5) schwache Homologie zu den Monocarboxylattransportern im Menschen aufweisen.

Neben dem Import, der die Zelle mit Riboflavin versorgt, gibt es auch Transportvorgänge, die Riboflavin aktiv aus der Zelle schleusen. Der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii*, der natürlicherweise Riboflavin überproduziert, scheidet das Vitamin durch einen aktiven und proteinvermittelten Prozess aus, der durch Inhibierung der Riboflavinaufnahme in die Zellen gesteigert werden konnte (64). Van Herwaarden et al. (260) fanden diese Aktivität auch in Brustdrüsenzellen von Säugern. Dort ist das zur



Familie der ATP binding cassette (ABC) Transporter gehörende „breast cancer resistance protein“ (BRCP) dafür verantwortlich, Riboflavin aktiv in die Muttermilch zu sezernieren.

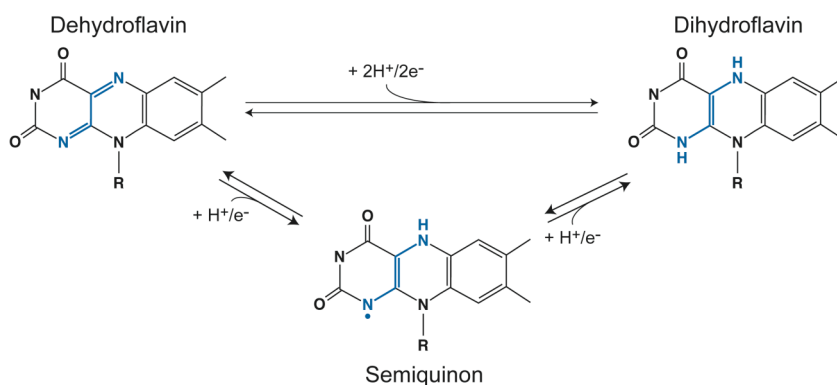
Im Gegensatz dazu besitzt das Gram-negative Bakterium *E. coli* ebenso wie die meisten Vertreter der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien kein Transportsystem für Riboflavin und ist daher zwingend auf seine endogene Biosynthese angewiesen (5).

#### I.A.4. Die Funktion von Flavinen

Die Cofaktoren FMN und FAD sind essentiell für die Aktivität einer Vielzahl von Enzymen im Stoffwechsel. Während die mangelnde Zufuhr von Vitaminen normalerweise zu einer ernsthaften Erkrankung führt, wie z.B. Beriberi (Vitamin B<sub>1</sub>) oder Skorbut (Vitamin C), treten bei einer Unterversorgung von Riboflavin keine typischen Mangelsymptome auf. Der Grund dafür ist seine Beteiligung an vielen unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen und Vorgängen im Körper.

##### I.A.4.1. Im Metabolismus

Die Hauptfunktion der Flavin-Coenzyme FMN und FAD ist die eines Elektronen-Carriers in einer Vielzahl von Oxidations- und Reduktionsreaktionen im zentralen Stoffwechsel, an denen Dehydrogenasen, Reduktasen, Oxidasen oder Hydroxylasen beteiligt sind. Die meisten Proteine tragen dabei FAD als prosthetische Gruppe, welches durch die Übertragung eines Elektrons zum Semiquinon oder durch zwei Elektronen – ebenfalls über das Semiquinon als Zwischenprodukt – zum Dihydroflavin reduziert werden kann (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7. Redoxreaktion der Flavine.** Das vollständig oxidierte Dehydroflavin kann durch die Übertragung eines Elektrons zum Semiquinon, durch die Übertragung von zwei Elektronen zum Dihydroflavin reduziert werden. (Die an den Reaktionen beteiligte Gruppe ist blau markiert)

Flavine nehmen somit eine Vermittlerrolle zwischen Zwei-Elektronen Redoxreaktionen (z.B. Succinat-Dehydrogenase oder Acyl-CoA-Dehydrogenase) und Ein-Elektronen Reaktionen (in der mitochondrialen Atmungskette) ein. Das Semiquinon ist in wässriger Lösung äußerst instabil, weshalb sich sehr schnell ein Gleichgewicht zwischen der oxidierten und der reduzierten Form des Flavins einstellt. An ein Protein gebunden, ist seine Stabilität jedoch deutlich gesteigert. Dihydroflavin

kann durch Reaktion mit einem Substrat – NAD(P)<sup>+</sup>, Cytochrom oder molekularem Sauerstoff – reoxidiert werden.

#### **I.A.4.2. In der DNA-Reparatur**

Das Flavoprotein Photolyase übernimmt eine sehr wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden. Unter dem Einfluss von UV-B Strahlung kommt es zur Ausbildung von Cyclobutan-Dipyrimidinen oder Pyrimidin-Pyrimidon-Dimeren, die nur reduktiv wieder gespaltet werden können. Ihre katalytische Aktivität erlangt die Photolyase erst durch Bestrahlung mit UV-A oder Blaulicht, das vom Chromophor 5,10-Methylentetrahydrofolat (MTHF) absorbiert wird. Die Anregungsenergie des Photons wird anschließend auf FADH abgegeben, wodurch das reduzierte Anion FADH<sup>-</sup> entsteht. Dieses überträgt ein Elektron auf das Basendimer und löst damit eine Isomerisierungsreaktion aus. Nach Reparatur des DNA-Schadens kehrt das Elektron zurück auf das Flavon FADH, das dadurch wieder zum Anion reduziert wird.

#### **I.A.4.3. Bei der Wahrnehmung von Blaulicht**

In Pflanzen und Tieren gibt es eine Gruppe von Proteinen, deren N-terminale Domäne eine hohe Ähnlichkeit zu bakteriellen Photolyasen, jedoch keine Aktivität für die DNA-Reparatur besitzt. Diese so genannten Cryptochrome sind Photorezeptoren, die mit ihren Chromophoren MTHF und FAD Blaulicht wahrnehmen können (1). Sie unterscheiden sich von den Photolyasen durch eine zusätzliche C-terminale Domäne (33, 140), die durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren auf die Promotoren bestimmter Gene wirken kann (272). Sowohl in Pflanzen als auch in Tieren spielen die Cryptochrome eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik eines Organismus, indem sie die Hell/Dunkel-Unterschiede wahrnehmen und die Regulation von Genen daran koppeln. So steuern sie beispielsweise Tages- und Jahreszeit-abhängig den Schlaf/Wach-Rhythmus, Stoffwechselvorgänge sowie die Photomorphogenese und Blühinduktion bei Pflanzen (141) und darin enthaltene Referenzen).

Neben den Cryptochromen gibt es noch eine weitere Klasse von Blaulichtrezeptoren, die Phototropine. Sie enthalten eine LOV Domäne (zur Wahrnehmung von Light Oxygen or Voltage) mit FMN als Cofaktor und sind z.B. für den Phototropismus, die Chloroplastenbewegung oder die Öffnung der Spaltzellen in Pflanzen verantwortlich. Proteine mit LOV-Domänen finden sich in allen drei Reichen des Lebens. Sie besitzen eine C-terminale Serin/Threonin-Kinase, die durch Anregung mit Blaulicht autophosphoryliert wird (27) und darin enthaltene Referenzen).

Eine neue Familie von Blaulichtrezeptoren wurde in Bakterien und dem Eukaryoten *Euglena gracilis* identifiziert, wo sie eine wichtige Rolle in der lichtabhängigen Fortbewegung (Photophobie), der Regulation der Transkription und der Phototaxis spielen. Ihr gemeinsames

Strukturelement ist eine BLUF (**B**lue **L**ight **U**sing **F**AD) Domäne, an die ein FAD-Cofaktor gebunden ist (70).

#### **I.A.4.4. Bei der Biolumineszenz**

Ein weiteres Beispiel einer flavinabhängigen Reaktion ist die Biolumineszenz, die hauptsächlich in marinen Lebewesen bekannt ist und besonders gut im Bakterium *Vibrio fischeri* untersucht wurde (165). Das Enzym Luciferase katalysiert mithilfe von molekularem Sauerstoff die Oxidation von FMNH<sub>2</sub> und eines langkettigen Fettsäurealdehyds. Neben FMN und der Fettsäure entsteht Licht der Wellenlänge 490 nm. Die Bedeutung von FMN als Cofaktor dieser Reaktion wird auch auf DNA-Ebene deutlich, da für Bakterien nicht nur eine räumliche Nachbarschaft des *lux* und des *rib* Operons, sondern auch eine gemeinsame Regulation gezeigt werden konnte (164, 249).

#### **I.A.5. Die Erforschung von Flavoproteinen**

Die Cofaktoren FMN und FAD können als prosthetische Gruppe kovalent oder nicht-kovalent an ein Apoprotein gebunden sein. Die kovalente Bindung, die nur bei etwa 10% der Flavoproteine zu finden ist, erfolgt dabei über die 8- $\alpha$ -Methylgruppe des Isoalloxazinrings unter Ausbildung einer sekundären Amino-, einer Ether-, oder Thioetherbindung an die Aminosäuren Histidin, Tyrosin oder Methionin des Proteins (57, 168). Dieses bildet Bindetaschen für die Flavine, z.B. einen „Rossman fold“, die zum Teil hochspezifisch entweder für FMN oder für FAD sind (79) und darin enthaltene Referenzen). Indem die Cofaktoren an das Apoprotein binden, verleihen sie ihm nicht nur seine katalytische Aktivität, sondern oftmals auch erst seine endgültige Tertiärstruktur und Stabilität.

Um die Reaktion von Flavoproteinen genauer zu erforschen, bedient man sich häufig nicht-natürlicher Flavinanaloga, die spezifische Substituenten oder eine radioaktive Markierung tragen. Diese erlauben unter anderem, Aussagen über Zugänglichkeit, Polarität, Stereospezifität oder Dynamik des aktiven Zentrums zu machen, was durch die Pionierarbeiten von Lamooy und seinen Mitarbeitern gezeigt werden konnte (53, 79, 118, 119 und darin enthaltene Referenzen). Der Austausch der natürlichen prosthetischen Gruppe gegen das Analogon muss sehr rasch und unter milden, nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgen, um die Tertiärstruktur des Flavoproteins zu erhalten. Es wurde eine Vielzahl von Strategien zur Präparation der Apoproteine entwickelt, die hauptsächlich auf Erniedrigung des pH-Werts sowie Erhöhung der Salzkonzentration und Temperatur beruhen und nur für Flavoproteine mit nicht-kovalent gebundenem Cofaktor geeignet sind. Kovalent gebundenes FMN oder FAD konnte bislang nur durch das Analogon substituiert werden, indem die an der Bindung beteiligten Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden. Eine andere Strategie beruht auf der heterologen Expression des Proteins in einer riboflavinauxotrophen Hefe in Gegenwart des Flavinanalogs (79, 172, 173). Die Rekonstitution von Flavoproteinen mit nicht-

natürlichen Cofaktoren ist oft zeitraubend, da verschiedene Bedingungen und Methoden getestet werden müssen, um eine quantitative Beladung und eine hohe Ausbeute an aktivem Protein zu erreichen.

## **I.A.6. Zielsetzung dieser Arbeit**

Bereits 1979 wurde von Cecchini et al. nachgewiesen, dass *B. subtilis* Zellen in der Lage sind, Riboflavin zu transportieren. Sie konnten eine Bindekomponente für Riboflavin aus der Membranfraktion von *B. subtilis* isolieren, das dafür verantwortliche Protein jedoch nicht identifizieren. Erst die Analyse bakterieller Genome durch Vitreschak et al. (263) brachte vier Genfamilien zutage, deren Expression durch ein konserviertes RFN-Element reguliert wird: *ypaA*, *ribM* (*pnuX*), *impX* und *rnfT*. Ihre Genprodukte sind hydrophobe Proteine und damit Kandidaten für mögliche Riboflavintransporter.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war, die Proteine YpaA aus *B. subtilis* und RibM aus *C. glutamicum* hinsichtlich ihrer Transportaktivität für Riboflavin zu überprüfen und zu charakterisieren.

Die Identifizierung und Erforschung der Riboflavintransporter war der erste Schritt bei der Herstellung von Flavoproteinen mit nicht-natürlichen Liganden. Die Synthese dieser Hybride gehörte zur Problemstellung, die im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK640 „Sensorische Photorezeptoren in natürlichen und künstlichen Systemen“ bearbeitet wurde. Zu diesem Zweck sollte ein bakterielles Expressionssystem etabliert werden, welches die Aufnahme eines von außen zugegebenen Analogons und seinen Einbau in neu synthetisierte Flavoproteine *in vivo* erlaubt. Die Herstellung von Hybrid-Flavoproteinen wurde an dem Flavin-bindenden Protein Dodecin (18, 72, 73, 166) erprobt, in das statt Riboflavin das Analogon Roseoflavin eingebaut werden sollte.

## I.B. Material und Methoden

### I.B.1. Material

#### I.B.1.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein und wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Das Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen Greiner, Roth, Sarstedt sowie Schubert & Weiss.

**American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, USA)** [<sup>3</sup>H(G)]Thiamin Hydrochlorid (ART-0710)

**Applichem (Darmstadt)** IPTG

**Becton Dickinson (LePont de Claix, Frankreich)** Yeast Extract, Trypton, Bacto Pepton, Bacto

Casaminosäuren, Bacto Agar (Difco)

**Biozym (Hessisch Oldendorf)** Low Melting Point Agarose

**Calbiochem (San Diego, USA)** G418, Digitonin

**Fluka (Buchs)** 5-(2-Hydroxymethyl)-4-methyl thiazole (#54405), Tryptophan (#93659)

**Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf)** Fuji medical X-ray film (100 NIF) Super RX

**GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)** D-[U-<sup>14</sup>C]Fruktose (CFB47)

**Invitrogen GmbH (Karlsruhe)** anti-green fluorescent protein, mouse IgG<sub>1</sub>, monoclonal 11E5 (A11121, Molecular Probes)

**Machery-Nagel (Düren)** porablot<sup>®</sup> NCL Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße)

**MBI Fermentas (St. Leon-Rot)** dNTPs, Restriktionsenzyme und Puffer, T4-DNA Ligase und Puffer, Taq DNA Polymerase und Puffer, GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb

**Merck (Darmstadt)** FMN, FAD

**Millipore (Molsheim, Frankreich)** „Steritop“-Sterilfilter (500 ml, Aufsatz auf Glasflaschen), Steriflip (50 ml Vacuum Sterilfiltration)

**MP Biomedicals/Qbiogene (Heidelberg)** Roseoflavin, YNB ohne Aminosäuren ohne Vitamine

**neoLab (Heidelberg)** Plastikimpfösen 1 und 10 µl, steril

**New England Biolabs (Schwalbach)** Alkalische Phosphatase (CIP), Restriktionsenzyme und Puffer, Phusion<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase, Proteinstandard, T4 DNA Polymerase

**Operon Biotechnologies GmbH (Köln)** Oligonukleotide

**Pall (Dreieich)** GN-6 Metrical Membran (0,45 µm Porengröße)

**Peqlab (Erlangen)** Universal Agarose

**Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn)** Streptavidin Horseradish Peroxidase conjugated (Pierce), SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce), SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)

**Polysciences Europe GmbH (Eppelheim)** Anti-Alkaline phosphatase [*E. coli*] in rabbit, IgG Fraktion (#23721-5)

**Qiagen (Hilden)** QIAprep Spin Miniprep Kit (50), QIAquick Gel Extraction Kit (50), MinElute Gel Extraktion Kit (50), Ni-NTA Agarose, Penta-His Antikörper (#34660)

**Roth (Karlsruhe)** Ampicillin (Na-Salz), Agar-Agar, BSA (Albumin Fraktion V), 2-ml Cryoröhrchen, Ethidiumbromid, Mikrotiterplatten rotilabo 96U, 0,2-ml PCR-MikroUltraTubes, Roti<sup>®</sup>-Aqua-Phenol, Roti<sup>®</sup>-Phenol, Rotiszint<sup>®</sup> eco plus, Spritzen-Sterilfilter „Rotilabo“ 0,22 µm, Tryptophan, X-Gal

**Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA)** polyclonal HA-probe (Y-11) Antibody (sc-805), monoclonal HA-probe (F-7) Antibody (sc-7392)

**Sarstedt (Nümbrecht)** 3-ml Fluoreszenz-Plastikküvetten

**Schleicher&Schuell (Dassel)** Nitrocellulose-Transfer-Membran „Protran“

**Schott (Jena)** Hybridisierungsröhrchen

**Serva (Heidelberg)** Ammoniumpersulfat

**Sigma-Aldrich (Steinheim)** Acriflavin, Aminosäuren, Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (A9044), anti-Rabbit Horseradish Peroxidase conjugated (A6154), Lumichrom, Lysozym (L2879), Triton X-100, TEMED, Ponceau S, RNase A

**Spectrum (Rancho Dominguez, USA)** Spectra/Por molecularporous membrane tubing (3,500 MWCO)

**USB (Bad Homburg)** Tris Base

[<sup>14</sup>C]Riboflavin (5,54 MBq/mg) war ein Geschenk von Prof. Dr. R. Krämer (Universität zu Köln). Die in dieser Arbeit verwendete Riboflavinlösung (160 µM) hatte eine Aktivität von rund 10 µCi/ml.

HMP (4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine) war ein Geschenk von Prof. Tagdh P. Begley (Cornell University, Ithaca, USA).

## I.B.1.2. Geräte

Amersham	Photometer Ultrospec 3100 pro
Appligene	Mini Hybridisation Oven
Bandelin	Sonoplus HD2070
Beckman	Szintillationsgerät LS 6000SC, Ultrazentrifuge L8-M, Optima™ TL Ultrazentrifuge
Biometra	T3-Thermocycler, Geldokumentation BiodocAnalyse
Bio-Rad	Gelapparatur Mini Protean II, Spannungsquelle
Christ	SpeedVac RVC 2-18
Eppendorf	Centrifuge 5417R, Zentrifuge Minispin plus, Thermomixer 5436 und Thermostat 5320
Heidolph	Heizplatte (mit Rührer) IKAMAF RH, Rührer MR 3000, Vortex REAX 2000
Hettich	Zentrifuge Rotina 35R
Heraeus Instruments	Wärmeschrank
ICN Biomedicals	Sterilbank BSB 4A
ISA Instruments	Fluoromax-2
Kern	Feinwaage 770 (10 mg bis 220 g)
Leica	Mikroskop DMLS
Memmer	Wärmeschränke
Mettler	Waage PJ 300
New Brunswick Scientific	Luftschüttler G25, transportabler Wasserbadschüttler G76
Packard	Cyclone Storage Phosphor System
Protec	Entwickler für Filme (Western Blot) Optimax 2010
Savant	SpeedVac Concentrator
Stratagene	UV Stratalinker 1800
UVP	Hand-UV-Lampe UVH 57 (302 nm)
Wolf	SANOclav Tischautoklav
WTW	Digital-pH-Meter ph525
Zeiss	Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta

## I.B.1.3. Datenbanken, Internetdienste und Software

<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center	<a href="http://www.bgsc.org/">http://www.bgsc.org/</a>
Broad Institute (MIT, Harvard)	<a href="http://www.broad.mit.edu/tools/data/seq.html">http://www.broad.mit.edu/tools/data/seq.html</a>
<i>E. coli</i> Genetic Stock Center	<a href="http://cgsc.biology.yale.edu/">http://cgsc.biology.yale.edu/</a>
GeneDB (Sanger Institute)	<a href="http://www.genedb.org/">http://www.genedb.org/</a>
Hydrophathie-Analyse	TMHMM <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
	TMPred <a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
Literaturrecherche	<a href="http://www.pubmed.com">http://www.pubmed.com</a>
NCBI Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
T-COFFEE Multiple Sequence Alignment (MSA)	<a href="http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&amp;daction=TCOFFEE::Regular">http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&amp;daction=TCOFFEE::Regular</a>
Sequenz Logo eines MSA	<a href="http://weblogo.berkeley.edu/">http://weblogo.berkeley.edu/</a>
Stammbaumanalyse	<a href="http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html">http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html</a>
Bearbeitung von DNA-Sequenzen	DNA Strider
Quantifizierung von Northern Blots	OptiQuant
Quantifizierung von Western Blots	MultiAnalyst

## I.B.1.4. Organismen

### I.B.1.4.1. *E. coli* Stämme

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3)</i>	
BSV11	F <sup>-</sup> <i>glnV44(AS) λ<sup>-</sup> mcrA0 rfbC1 endA1 ribB11:Tn5 spoT1 thi-1 mcrB9999 hsdR29</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center EGSC, No. 6991
BSV13	F <sup>-</sup> <i>glnV44(AS) λ<sup>-</sup> mcrA0 ribA13:Tn5 rfbC1 endA1 spoT1 thi-1 mcrB9999 hsdR29</i>	EGSC, No. 6993
DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) λ<sup>-</sup></i>	Laborkollektion

### I.B.1.4.2. *B. subtilis* Stämme

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>B. subtilis</i> Marburg 168 (Bs168)	<i>trpC2</i>	Laborkollektion
QB5350 ( <i>ptsH</i> )	<i>trpC2 ptsH-H15A amyE::(levD-lacZ-aphA3)</i>	(247)
<i>B. subtilis ribC1</i>		(235)
<i>ΔypaA::Kan<sup>r</sup></i>	pDG780-ypaA/ScaI → Bs168	DA
<i>ΔribB::Em<sup>r</sup></i>	pCH1- <i>ribB</i> -Em/ScaI → Bs168	DA
<i>ΔribB::Tc<sup>r</sup></i>	pCH1- <i>ribB</i> -Tc <sup>r</sup> /ScaI → Bs168	DA
<i>ΔribB::Tc<sup>r</sup> ypaA-8His</i>	pMUTIN-ypaA-8His → <i>ΔribB::Tc<sup>r</sup></i>	DA
<i>ΔribB::Tc<sup>r</sup></i>	pMUTIN2- <i>ribA</i> ' → <i>ΔribB::Tc<sup>r</sup></i>	DA
<i>ΔribA::pMUTIN2</i>		
<i>ΔribB::Em<sup>r</sup> ΔypaA::Kan<sup>r</sup></i>	pDG780-ypaA/ScaI → <i>ΔribB::Em<sup>r</sup></i>	DA
<i>ΔribB::Tc<sup>r</sup> ypaA-HA</i>	pMUTIN-ypaA-HA	→ <i>ΔribB::Tc<sup>r</sup></i> DA
<i>ΔamyE::(RFN-ypaA-8His)</i>	pDG364-RFN-ypaA-8His/ScaI	
<i>ΔribB::Tc<sup>r</sup> ypaA-8His</i>	pMUTIN-ypaA-8His	→ <i>ΔribB::Tc<sup>r</sup></i> DA
<i>ΔamyE::(RFN-ypaA-BIO)</i>	pDG364-RFN-ypaA-BIO/ScaI	
<i>ΔribB::Em<sup>r</sup> ΔypaA::Kan<sup>r</sup></i>	pIX12-SdribM/PstI → <i>ΔribB::Em<sup>r</sup> ΔypaA::Kan<sup>r</sup></i>	DA
<i>ΔsacB::(pIX12-SdribM)</i>		
<i>ribC1 ypaA-ZZ</i>	pMUTIN-ypaA-ZZ → <i>ribC1</i>	DA
<i>ribC1 ypaA-ZZ</i>		
<i>ΔamyE::(pX-8His-ribA)</i>	pX-8His- <i>ribA</i> /ScaI → <i>ribC1 ypaA-ZZ</i>	DA
<i>ribC1 ΔypaA</i>	pDG780-ypaA/ScaI → <i>ribC1</i>	DA
<i>ribC1 ΔsacB::pIX12</i>	pIX12/PstI → <i>ribC1</i>	DA
<i>ribC1</i>		
<i>ΔsacB::(pIX12-SdribM)</i>	pIX12-SdribM/PstI → <i>ribC1</i>	DA

(DA = Diese Arbeit); der Pfeil steht für die Transformation des jeweiligen zirkulären oder linearisierten Plasmids in den angegebenen *B. subtilis* Stamm.

## I.B.1.5. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
CV35	AAG GAG GAA GCA GGT <b>GTG</b> AAA GTA AAA AAA TTA GTT GTG GTC	fwd, <i>ypaA</i> Überexpression, <b>Start-GTG</b> , Adaptorsequenz für pDG148-Stu Klonierung
CV36	GAC ACG CAC GAG GTT <b>TAA</b> TGG ATA TGT GCA CTT CGC TG	rev, <i>ypaA</i> Überexpression, <b>Stop-Codon</b> , Adaptorsequenz für pDG148-Stu Klonierung
CV41	ATA <u>TGC GGC CGC</u> CGG ACA AAT TGT CGG AAT GGG	fwd, <i>ribE</i> Knockout, mit CV42 Amplifikation von <i>ribE</i> mit 998 bp up- und 994 bp downstream Region, <u>NotI</u>
CV42	ATA <u>TGC GGC CGC</u> GGC AAG AAT CCA AGC GCC TC	rev, <i>ribE</i> Knockout, mit CV41 Amplifikation von <i>ribE</i> , <u>NotI</u>
CV49	GCT CAG GAA AAG GCC ATT TTA CC	fwd, Nachweis der Erythromycin Resistenzkassette, 555 bp Produkt mit CV50
CV50	CGT CAA TTC CTG CAT GTT TTA AGG	rev, mit CV49 Nachweis der Erythromycin Resistenzkassette
CV51	ATA TGG TAC CGT GAA AGT AAA AAA ATT AGT TGT GGT CAG C	fwd, mit CV52 Amplifikation von <i>ypaA</i> zur Klonierung in pMUTIN Vektoren, <u>KpnI</u>
CV52	ATA TCG GCC GAT GGA TAT GTG CAC TTC GCT GC	rev, mit CV51 Amplifikation von <i>ypaA</i> ohne Stop- Codon zur Klonierung in pMUTIN Vektoren, <u>EagI</u>
CV53	ATA <u>TAT GCA TTT</u> AGT GAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT GGA TAT GTG CAC TTC GC	rev, mit CV51 Amplifikation von <i>ypaA</i> und Fusion mit <i>8His-Epitop</i> zur Klonierung in pMUTIN Vektoren (dabei wird HA-Epitop in Vektor entfernt), <b>Stop-Codon</b> , <u>NsiI</u>
CV54	GCT GCC TGT TCC AAA GGT CCT GC	fwd, Nachweis der Kanamycin Resistenzkassette, 359 bp Produkt mit CV55
CV55	CGC CGT GGG AAA AGA CAA GTT CC	rev, mit CV54 Nachweis der Kanamycin Resistenzkassette
CV56	GGT GCA GCT GCA TTT CCA GC	fwd, Nachweis der Tetracyclin Resistenzkassette, 539 bp Produkt mit CV57
CV57	CCG ATT TCG GCA GTA CTT AGC TGG	rev, mit CV56 Nachweis der Tetracyclin Resistenzkassette
CV60	ATA <u>TCT CGA GCG</u> TGC ACA GTC ATA CCG AAC G	fwd, <i>ypaA</i> Knockout, mit CV61 Amplifikation eines 1039 bp 5'-Bereiches (-992 bis +48) von <i>ypaA</i> zur Klonierung in pDG780, <u>XhoI</u>
CV61	ATA TGT CGA CGC AAT GCT GCT CAG CAT GC	rev, mit CV60 Amplifikation des 5' Bereiches für <i>ypaA</i> Knockout, <u>Sall</u>
CV62	ATA <u>TGA ATT CCC</u> ATG GAT TGA GCA GCA GC	fwd, <i>ypaA</i> Knockout, mit CV63 Amplifikation eines 1028 bp 3'-Bereiches (+535 bis +1563) von <i>ypaA</i> zur Klonierung in pDG780, <u>EcoRI</u>
CV63	ATA <u>TTC TAG ACC</u> TTT GTG ACA GGG ATA TAC TGC C	rev, mit CV62 Amplifikation des 3'-Bereiches für <i>ypaA</i> Knockout, <u>XbaI</u>
CV64	CCA AGA TAT TCT ACA GTT TCA ATT CCC	fwd, Nachweis der Erythromycin Resistenzkassette in pMUTIN Vektoren, 255 bp Produkt mit CV65
CV65	GGT TTA GGA TGA AAG CAT TCC G	rev, mit CV64 Nachweis der Erythromycin Resistenzkassette in pMUTIN Vektoren
CV67	ATA <u>TCG GCC GGG</u> ATC CGG ACG CGT TGG AGC	fwd, mit CV68 Amplifikation C-terminaler Epitope (BIO, ZZ, 9myc) aus pVT100, <u>EagI</u>
CV68	ATA <u>TCT GCA GCA</u> TAA ATC ATA AGA AAT TCG CGA GCT CAC G	rev, mit CV67 Amplifikation C-terminaler Epitope (BIO, ZZ, 9myc) aus pVT100, <b>Stop-Codon</b> , <u>NsiI</u>
CV69	ATA TGG ATC <u>CAT GAG AGG CTC ACA TCA CCA</u> <b>TCA CCA TCA CCA TCA CGC TAG</b> CTT TCA TCC GAT AGA AGA AGC ACT GGA CG	fwd, mit CV70 Amplifikation von <i>ribA</i> und N-terminale Fusion mit <i>MRGS-8His-Epitop</i> zur Klonierung in pX Vektor, <u>BamHI</u>
CV70	ATA TGG ATC <u>CGG CGC GCC</u> TTA GAA ATG AAG TAA ATG ACC TAG CTT GTT C	rev, mit CV69 Amplifikation von <i>ribA</i> zur Klonierung in pX Vektor, <u>BamHI</u> , <u>AseI</u>
CV80	ATA TGG ATC <u>C AA GCT TAT</u> GAA TCC TAT AAC CGA ATT ATT AG	fwd, mit CV81 Amplifikation von <i>ribM</i> aus <i>C. glutamicum</i> , <u>BamHI</u> , <u>HindIII</u>
CV81	ATA <u>TAG ATC TGA</u> CTG TCA CAG ACT CCT GAG C	rev, mit CV80 Amplifikation von <i>ribM</i> , <u>BglIII</u>
CV90	ATA <u>TGT CGA CAT</u> GGA TAT GTG CAC TTC GCT GC	rev, <i>ypaA5-gfp/phoA/lacZ</i> , Amplifikation von <i>ypaA</i> ohne Stop-Codon, <u>Sall</u>
CV94	ATA <u>TCT CGA GGG ATC CGG</u> AGC TTG GCT GTT GC	fwd, <i>ypaAX-lacZ</i> , mit CV94 Amplifikation von <i>lacZ</i> aus pMELbeta2 ohne Start-ATG und 2. Aminosäure (Phe), <u>XhoI</u> , <u>BamHI</u>
CV95	GAC ACG CAC GAG <u>GTG TCG ACT</u> TAT TTT TGA CAC CAG ACC AAC TGG	rev, mit CV94 Amplifikation von <i>lacZ</i> aus pMELbeta2, Adaptorsequenz für pDG148-Stu Klonierung, <u>Sall</u>
CV96	ATA <u>TGT CGA CCG</u> CGC TGT CGG ATA ATG CC	rev, <i>ypaA4-gfp/lacZ/phoA</i> , Amplifikation von <i>ypaA-4</i> mit TMDs 1-4 ohne Stop-Codon, <u>Sall</u>
CV97	ATA <u>TGT CGA CTT</u> TAC CCC TGT GAC AAA AGC CC	fwd, <i>ypaAX-phoA</i> , mit CV98 Amplifikation von <i>phoA</i> ohne Signalsequenz (aa 1-14), <u>Sall</u>



CV98	<i>GAC ACG CAC GAG GTG TCG ACT</i> TAT TTC AGC CCC AGA GCG G	rev, <i>ypaA-phoA</i> , mit CV97 Amplifikation von <i>phoA</i> , <i>Adaptorsequenz</i> für pDG148-Stu Klonierung, <i>Sall</i>
CV99	ATA <i>TCA TAT GAA</i> TCC TAT AAC CGA ATT ATT AGA CG	fwd, <i>ribM-6His</i> , mit CV100 Amplifikation von <i>ribM</i> ohne Stop-Codon zur Klonierung in pET24a(+), <i>NdeI</i>
CV100	ATA <i>TCT CGA GGA</i> CTG TCA CAG ACT CCT GAG C	rev, <i>ribM-6His</i> , mit CV99 Amplifikation von <i>ribM</i> ohne Stop-Codon, <i>XhoI</i>
CV103	ATA <i>TGT CGA CTG</i> CTG AGT TGA GTT TTT TAA ATA AGA AAG C	rev, <i>ypaA3-gfp/lacZ/phoA</i> , Amplifikation von <i>ypaA-3</i> mit TMDs 1-3 ohne Stop-Codon, <i>Sall</i>
CV104	ATA <i>TGT CGA CGG CGC AGG CGC</i> ATC TAA AGG TGA AGA ATT ATT CAC TGG	fwd, <i>ypaAX-gfp</i> , mit CV105 Amplifikation von <i>gfp2</i> ohne Start-ATG, <i>VDGAGA Linker</i> , <i>Sall</i>
CV105	<i>GAC ACG CAC GAG GTG TCG ACT</i> TAT TTG TAC AAT TCA TCC ATA CCA TGG	rev, <i>ypaAX-gfp</i> , mit CV104 Amplifikation von <i>gfp2</i> , <i>Adaptorsequenz</i> für pDG148-Stu Klonierung, <i>Sall</i>

## I.B.1.6. Plasmide

### I.B.1.6.1. *E. coli* Vektoren

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
Litmus28	ColE1 Replicon, fl ori, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> , T7 Promotor	New England Biolabs
pBluescript II SK(-)	ori, <i>bla</i> , <i>lacZα</i>	Stratagene
pCH1	pUC19 Derivat, EcoRI/HindIII Verdau von pUC19, Behandlung mit Mung-Bean Nuklease und Ligation eines NotI-Linkers	Huemmer, C., Erlangen
pET21a(+)	Expressionsvektor, pBR322 origin, fl origin, <i>bla</i> , <i>lacI</i> , T7 Promotor, T7-Epitop (N-terminal), His-Epitop (C-terminal), T7 Terminator	Novagen
pET24a(+)	Expressionsvektor, pBR322 origin, fl origin, kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , T7 Promotor, T7-Epitop (N-terminal), His-Epitop (C-terminal), T7 Terminator	Novagen
pET28a(+)	Expressionsvektor, pBR322 origin, fl origin, kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , T7 Promotor, His-Epitop und T7-Epitop (N-terminal), His-Epitop (C-terminal), T7 Terminator	Novagen
pUC18/19	pMB1 Replicon <i>rep</i> , ori, <i>bla</i> , <i>lacZα</i>	(287)
pET21a(+)- <i>ribM</i> -3HA	<i>ribM</i> wurde als HindIII/BglII Fragment aus pDG148- <i>ribM</i> -6His in pVT100U-3HA und von dort mit HindIII/EcoRI in pET21a(+) kloniert.	Diese Arbeit
pET21a(+)- <i>ypaA</i> -6His	Das PCR-Produkt von <i>ypaA</i> (CV111/CV90) wurde als NdeI/Sal Fragment in pET21a(+) kloniert.	
pET28a(+)- <i>ribM</i> -6His	<i>ribM</i> wurde ohne Stop-Codon amplifiziert (CV99/CV100) und mit NdeI/XhoI in pET24a(+) und von dort mit XbaI/XhoI in pET28a(+) kloniert.	
pET28a(+)-Dodecin-6His	Dodecin wurde durch PCR (T7/CV106) mit einem C-terminalen 6His-Epitop fusioniert und als XbaI/XhoI Fragment in pET28a(+) kloniert.	

### I.B.1.6.2. *B. subtilis* Vektoren

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pDG148	ori, <i>bla</i> , <i>lacZα</i> , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>lacI</i> , <i>P<sub>spac</sub></i>	BGSC, (104)
pDG148-Stu	<i>E. coli/B. subtilis</i> Shuttlevektor, der IPTG-induzierbare Überexpression in beiden Organismen erlaubt. pBR322 ori ( <i>E. coli</i> ), <i>bla</i> , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>lacI</i> , <i>P<sub>spac</sub></i> , pUB110 ori ( <i>B. subtilis</i> )	
pDG364	Integrativ, ori, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>spc</i> , <i>amyE</i> , 'amyE'	BGSC, (46)
pDG647	Vektor basierend auf pSB119 mit Erythromycin-Resistenzkassette	BGSC, (75)
pDG780	Vektor basierend auf pBluescriptKS(+) mit Kanamycin-Resistenzkassette	BGSC, (75)
pDG1514	Vektor basierend auf pMTL23 mit Tetracyclin-Resistenzkassette	BGSC, (75)
pIX12	Integrativ ( <i>sacB</i> Locus), ori, <i>bla</i> , <i>ermB</i>	Mack, M. Mannheim
pMUTIN-HA	Integrativ, ori, <i>bla</i> , <i>ermB</i> , <i>lacI</i> , <i>P<sub>spac</sub></i> , HA-Epitop, <i>trpAT</i>	BGSC, (110)
pMUTIN-GFP+	Integrativ, ori, <i>bla</i> , <i>ermB</i> , <i>lacI</i> , <i>P<sub>spac</sub></i> , <i>gfp+</i> , <i>trpAT</i>	BGSC, (110)
pX	ori, <i>cat</i> , <i>amyE</i> back, <i>bla</i> , <i>amyE</i> front, <i>xyIR</i> , <i>P<sub>xyIA</sub></i>	(117)

pCH1- <i>ribB</i> -Em <sup>r</sup>	<i>ribB</i> wurde mit 1-kb langen 5'- und 3'-Bereichen amplifiziert (CV41/CV42) als NotI Fragment in pCH1 kloniert. Die Em <sup>r</sup> -Kassette wurde durch SmaI/ClaI aus pDG647 gewonnen und in die natürlichen Schnittstellen EcoRV (verkürzt <i>ribG</i> um 27 bp im 3'-Bereich) und ClaI (schneidet in <i>ribB</i> ) inseriert.	DA
pCH1- <i>ribB</i> -Tc <sup>r</sup>	Die Em <sup>r</sup> -Kassette von pCH1- <i>ribB</i> -Em <sup>r</sup> wurde durch SmaI/ClaI mit der Tc <sup>r</sup> -Kassette aus pDG1514 ersetzt	DA
pDG148- <i>ypaA5-gfp</i>	Fusionsprotein aus YpaA (TMDs 1-5) und GFP	DA*
pDG148- <i>ypaA4-gfp</i>	Fusionsprotein aus verkürztem YpaA (TMDs 1-4) und GFP	DA*
pDG148- <i>ypaA3-gfp</i>	Fusionsprotein aus verkürztem YpaA (TMDs 1-3) und GFP	DA*
pDG148- <i>ypaA5-lacZ</i>	Fusionsprotein aus YpaA (TMDs 1-5) und LacZ	DA*
pDG148- <i>ypaA4-lacZ</i>	Fusionsprotein aus verkürztem YpaA (TMDs 1-4) und LacZ	DA*
pDG148- <i>ypaA3-lacZ</i>	Fusionsprotein aus verkürztem YpaA (TMDs 1-3) und LacZ	DA*
pDG148- <i>ypaA5-phoA</i>	Fusionsprotein aus YpaA (TMDs 1-5) und PhoA	DA*
pDG148- <i>ypaA4-phoA</i>	Fusionsprotein aus verkürztem YpaA (TMDs 1-4) und PhoA	DA*
pDG148- <i>ypaA3-phoA</i>	Fusionsprotein aus verkürztem YpaA (TMDs 1-3) und PhoA	DA*
pDG148- <i>ribM</i> -6His	Das PCR-Produkt von <i>ribM</i> (CV80/81) wurde als BamHI/BglII Fragment in pQE60 kloniert, was zur C-terminalen Fusion mit dem 6His-Epitop führte. Von dort wurde <i>ribM</i> -6His als HindIII in pDG148 ligiert.	DA
pDG148-Stu- <i>ribM</i> -6His	<i>ribM</i> -6His wurde mit CV112/CV113 amplifiziert und mithilfe der Adaptorsequenzen in pDG148-Stu inseriert.	DA
pDG148-Stu- <i>impX</i> -6His	Das PCR-Produkt von <i>impX</i> (CV78/CV79) wurde als NcoI/BamHI Fragment in pQE60 kloniert, was zur C-terminalen Fusion mit dem 6His-Epitop führte. <i>impX</i> -6His wurde anschließend mit CV122/CV113 amplifiziert und in pDG148-Stu ligiert.	DA
pDG148-Stu- <i>ypaA</i>	<i>ypaA</i> wurde durch PCR amplifiziert (CV35/CV36) und in pDG148-Stu kloniert	DA
pDG364-RFN- <i>ypaA</i> -BIO	<i>ypaA</i> wurde zusammen mit einem 1-kb langen 5'-Bereich (RFN) amplifiziert (CV60/PR11) und als XhoI/PstI (PstI schneidet in <i>ypaA</i> ) in pTRCHISA ligiert, wodurch ein 3'-verkürztes <i>ypaA</i> entsteht. Der 3'-Bereich von <i>ypaA</i> fusioniert an die Biotinylierungsdomäne (BIO) wurde aus pMUTIN- <i>ypaA</i> -BIO mit PstI/EcoRI ausgeschnitten und mit RFN- <i>ypaA</i> als BamHI/PstI Fragment aus pTRCHISA-RFN- <i>ypaA</i> in BamHI/EcoRI in einer 3-Wege Ligation kloniert.	DA
pDG780- <i>ypaA</i>	<i>ypaA</i> -Knockout Konstrukt. Ein jeweils 1-kb langer 5'- und 3'-Bereich von <i>ypaA</i> wurde amplifiziert (CV60/CV61 bzw. CV62/CV63) und als XhoI/SalI bzw. EcoRI/XbaI Fragment in XhoI up- bzw. in EcoRI/XbaI downstream der Km <sup>r</sup> -Kassette in pDG780 inseriert.	DA
pIX12-SdribM	SdribM aus <i>S. davawensis</i> als NdeI/PstI Fragment in pIX12. Der Vektor kann zur Transformation mit PstI linearisiert werden.	Matthias Mack, Mannheim
pMUTIN- <i>ypaA</i> -BIO	Austausch des HA-Epitops in pMUTIN- <i>ypaA</i> -HA durch die BIO-Domäne (CV67/68) als EagI/PstI Fragment in EagI/NsiI	DA
pMUTIN- <i>ypaA</i> -GFP	Austausch des HA-Epitops durch <i>gfp+</i> aus pMUTIN-GFP+ mit EagI/KasI	DA
pMUTIN- <i>ypaA</i> -HA	PCR-Produkt von <i>ypaA</i> (CV51/CV52) als KpnI/EagI Fragment in pMUTIN-HA	DA
pMUTIN- <i>ypaA</i> -8His	PCR-Produkt von <i>ypaA</i> -8His (CV51/CV53) als KpnI/NsiI Fragment in pMUTIN-HA, wodurch das HA-Epitop entfernt wird	DA
pMUTIN- <i>ypaA</i> -ZZ	PCR-Produkt von <i>ypaA</i> (CV51/CV52) als KpnI/EagI Fragment in pMUTIN-HA. Das HA-Epitop wurde mit EagI/PstI durch die ZZ-Domäne (PCR mit CV67/CV68) ersetzt.	DA
pMUTIN2- <i>ribA</i> '	Knockout-Konstrukt für <i>ribA</i> . Ein etwa 450 bp langes HindIII-Fragment wurde in HindIII von pMUTIN2 kloniert.	DA
pX-8His- <i>ribA</i>	<i>ribA</i> (CV69/CV70) wurde durch PCR mit dem N-terminalen Epitop MRSG(H) <sub>8</sub> AS versehen und als BamHI Fragment in pX kloniert. <i>ribA</i> kann durch NheI/AscI entfernt werden, wodurch das N-terminale 8His-Epitop im Vektor zurückbleibt.	DA

DA = Diese Arbeit; \* Die Klonierungsstrategie dieser Plasmide ist unter I.B.2.1 beschrieben.

## I.B.1.7. Medien, Puffer und Lösungen

### I.B.1.7.1. Medien

CSEG	Minimalmedium für <i>B. subtilis</i> (158) 16 g/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ , 4,1 g/l $KH_2PO_4$ , 3,3 g/l $(NH_4)_2SO_4$ 0,12 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 1,5 mg/l $MnSO_4$ , 22 mg/l Ammoniumeisencitrat, 6 g/l Natriumsuccinat, 8 g/l Kaliumglutamat, 5 g/l Glukose 50 mg/l L-Tryptophan ( <i>B. subtilis</i> 168)
LB	Vollmedium für <i>B. subtilis</i> (Flüssigkultur) 10g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
M9	Minimalmedium für <i>E. coli</i> 10% 10x M9-Salze (60 g/l $Na_2HPO_4$ , 30 g/l $KH_2PO_4$ , 10 g/l $NH_4Cl$ , 5 g/l NaCl, pH 7,4) (v/v), 11 mg/l $CaCl_2$ , 0,25 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,34 g/l Thiamin-HCl, 20 mg/l Prolin, 2 g/l Glukose
MNGE	Transformationsmedium für <i>B. subtilis</i> 13,6 g/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ , 6 g/l $KH_2PO_4$ , 1 g/l Natriumcitrat $\times 2H_2O$ , 20 g/l Glukose, 2 g/l Kaliumglutamat, 11 mg/l Ammoniumeisencitrat, 0,74 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$ 50 mg/l L-Tryptophan ( <i>B. subtilis</i> 168) 50 mg/l Histidin ( <i>B. subtilis ribCI</i> )
SOB	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,584 g/l NaCl, 0,186 g/l KCl
50x SOC	180 g/l Glukose, 47,6 g/l $MgCl_2$ , 60 g/l $MgSO_4$
SP	Vollmedium für <i>B. subtilis</i> (Platten) (158) 8 g/l Nutrient Broth, 0,25 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,75 g/l KCl Nach dem Autoklavieren, Zugabe von 55 mg/l $CaCl_2$ , 1,3 mg/l $MnCl_2$ , 4,4 mg/l Ammoniumeisencitrat
2TY	Vollmedium für <i>E. coli</i> 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

SP und 2TY Platten wurden mit 2% Agar, CSEG und M9 Platten mit 2% Bacto-Agar hergestellt. Zur Selektion wurden die Medien mit Ampicillin (100 mg/l), Erythromycin/Lincomycin (E/L, 1 mg/l bzw. 25 mg/l), Kanamycin (5 mg/l), Phleomycin (0,5 µg/ml) oder Tetracyclin (30 mg/l) versetzt. Um ein Blau/Weiß-Screening auf 2TY Platten zu ermöglichen, wurden dem Medium 10 mg/l IPTG und 0,004% X-Gal zugegeben.

### I.B.1.7.2. Puffer und Lösungen

5x Bradford Färbelösung	0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250, 23,5% Ethanol, 42,5% $H_3PO_4$ (85%ig)
Coomassie Färbelösung	0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure
2% Digitonin (sehr giftig)	16 mg Digitonin mit 400 µl siedendem Wasser mischen, 15 min bei 95°C und über Nacht bei 4°C inkubieren. Aus der nach dem Kochschritt klaren Lösung fiel in der Kälte wieder ein Teil des Digitonins aus, das durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Der Überstand hat eine Konzentration von 2% und ist bei 4°C rund eine Woche haltbar.

Chemilumineszenz-Lösungen zum Nachweis der Peroxidase im Western Blot	<p><i>Lösung 1</i> 2,5 mM Luminol (in DMSO), 0,4 mM p-Coumarinsäure (in DMSO), 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)</p> <p><i>Lösung 2</i> 0,019% Wasserstoffperoxid, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)</p> <p>Im Kühlschrank gelagert und mit Alufolie gegen Lichteinfall geschützt, besitzen die Lösungen eine Haltbarkeit von einigen Wochen.</p>
LD-Mix	10 mg/ml Lysozym, 1 mg/ml DNase aliquotieren und bei -20°C lagern
Lysispuffer (chrom. DNA)	20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 4 mg/ml Lysozym (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Lysis-Puffer (Membranprot.)	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM MgSO <sub>4</sub>
Overlay-Lösung	5 mg/ml Low Melting Point Agarose in (25 ml pro Platte) 50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0), 0,05% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal), 7 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml Lysozym, 2% Triton X-100 (v/v)
10x PBS	80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
10x Probenpuffer (Agarosegel)	60% Glycerin, 100 mM EDTA, 0,35% Bromphenol Blau, 0,25% Xylen Cyanol
Resuspendierungspuffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA
RNase A in TE	10 mg/ml RNase A in Na-Acetat (pH 5,2) 15 min bei 100°C inkubieren. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur den pH-Wert auf 7,4 mit 0,1 Volumenteil 1 M Tris/HCl (pH 7,4) einstellen. Aliquotieren und bei -20°C lagern.
5x SDS-Laufpuffer	1,5% Tris, 0,5% SDS, 7,2% Glycin
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 8% SDS, 20% Glycerin, 20% β-Mercaptoethanol, 0,4% Bromphenol Blau
SDS-Sammelgelpuffer	139 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,11% SDS
3x SDS-Trenngelpuffer	1,126 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,3% SDS
STET-Puffer	8% Saccharose, 5% Triton X-100 (v/v), 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
TB-Puffer	10 mM PIPES, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl pH 6,7 (mit KOH) 55 mM MnCl <sub>2</sub> zugeben und sterilfiltrieren
5x TBE Puffer	445 mM Tris/HCl, 445 mM Borsäure, 5 mM EDTA
TE-Puffer (DNA)	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
TE-Puffer (Proteine)	25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA
TMS-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 16 mM MgCl <sub>2</sub> , 33% Saccharose, 300 µg/ml Lysozym
2x Transferpuffer (Western Blot)	0,48% Tris, 2,24% Glycin, 0,4% Methanol, 0,04% SDS
Transportpuffer	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,0), 50 mM MgCl <sub>2</sub>
5x Z-Puffer	27,5 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 42,5 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3,75 g/l KCl, 0,6 g/l MgSO <sub>4</sub> , pH 7,0 (mit HCl oder NaOH) Vor Gebrauch wird dem 1x Z-Puffer 50 mM β-Mercaptoethanol zugegeben

## **I.B.2. Methoden**

### **I.B.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **I.B.2.1.1. Standardmethoden**

Molekularbiologische Standardmethoden (Agarose-Gelelektrophorese, Restriktionsverdau, CIP-Behandlung, Ligation) wurden nach (220) durchgeführt. Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAGEN Gelextraktion Kit.

#### **I.B.2.1.2. Plasmide zur Untersuchung der Topologie von YpaA**

Die Vorhersage der putativen Transmembrandomänen von YpaA erfolgte mit TMPred (83). Der komplette ORF von YpaA mit allen fünf TMDs (YpaA5) bzw. die C-terminal verkürzten Versionen YpaA4 (TMDs 1-4, aa 1-146) oder YpaA3 (TMDs 1-3, aa 1-103) wurden durch PCR mit den Primerpaaren CV51/CV90 (*ypaA5*), CV51/CV96 (*ypaA4*) bzw. CV51/CV103 (*ypaA3*) amplifiziert und als KpnI/SalI Fragmente in pUC18 (KpnI/Sal) kloniert. Anschließend wurden die Gene *gfp* (Green Fluorescence Protein, in dem das Start-ATG gegen einen VDGAGA Linker ersetzt wurde) mit CV104/CV105 bzw. *phoA* (Alkalischen Phosphatase aus *E. coli* ohne die ersten 14 Aminosäuren, die das Signalpeptid bilden) mit CV97/98 amplifiziert und als SalI Fragment unter Beachtung der Orientierung in die Plasmide pUC18-*ypaAX* inseriert. Die Fusionen wurden dann mit den Primerpaaren CV35/CV105 (*ypaAX-gfp*) bzw. CV35/CV98 (*ypaAX-phoA*) erneut amplifiziert und mithilfe der Adaptorsequenzen in pDG148-Stu kloniert, in dem der *P<sub>spac</sub>* Promotor eine Überexpression der Fusionsproteine erlaubt.

Für die Fusion von *ypaA* mit *lacZ* wurde das Gen der  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* mit CV95/CV96 durch PCR amplifiziert (wodurch eine XhoI Schnittstelle am 5'-Ende eingefügt wird) und anschließend blunt in pUC18 (SmaI) kloniert. Die PCR-Produkte der verschiedenen Versionen von *ypaA* wurden wie zuvor als KpnI/SalI Fragmente in das Plasmid pUC18-*lacZ* (KpnI/XhoI) vor das *lacZ* Gen eingefügt. Die Fusionen wurden mit dem Adaptor-Primerpaar CV35/CV95 amplifiziert und in pDG148-Stu kloniert.

#### **I.B.2.1.3. Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* (90)**

Ein Volumen von 10 ml 2TY Medium wurde mit einer Einzelkolonie frisch ausgestrichener Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Damit wurden 250 ml SOB auf OD<sub>600</sub> = 0,02 bzw. 0,05 angeimpft, die bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6 (12-18 Stunden) geschüttelt wurden. Die Kulturen wurden 10 min im Eis/Wasserbad unter Schütteln abgekühlt und anschließend geerntet (10 min, 2.500 x g, 4°C). Die Zellen wurden in eiskaltem, sterilen TB-Puffer aufgenommen, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml TB-Puffer resuspendiert, dem 20% Glycerin zugesetzt wurden. Die aliquotierten kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der DNA 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für eine Minute wurden die Zellen für 1 min auf Eis abgekühlt, bevor 1 ml 2TY zugegeben wurde. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C, um die Antibiotika-Resistenz auszubilden. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt, das Pellet im verbleibenden Medium resuspendiert und auf 2TY-Selektionsplatten ausplattiert.

Für *chemisch kompetente* Zellen wurden 50 ml SOB Medium (das im Fall von XL1-Blue 50 µg/ml Tetracyclin enthielt) mit 0,5 ml der 2TY-Kultur angeimpft. Nach etwa 2 Stunden, wenn eine OD<sub>600</sub> = 0,25-0,3 erreicht war, wurden 35 ml in ein 50-ml Falcontube überführt und für 15 min auf Eis inkubiert bevor die Zellen geerntet wurden (5 min, 2500 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 35 ml einer eiskalten, sterilen 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen, für 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> vorsichtig resuspendiert und

entweder direkt verwendet oder nach Zugabe von 70 µl DMSO pro 2 ml Zellsuspension und 15 min Inkubation auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **I.B.2.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Der Standard-Ansatz für Taq und Vent Polymerase enthielt 50-100 ng DNA, 1x ThermoPol-Puffer, 0,25 mM dNTP-Mix, je 100 pmol Primer und 2 U Polymerase in einem Volumen von 25 µl.

Reaktionen mit dem Phusion High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **I.B.2.1.5. Subklonierung von blunt PCR-Produkten**

Diese Methode der Subklonierung kann nur für PCR-Produkte verwendet werden, die keine interne EcoRV oder SmaI Schnittstelle besitzen.

Ein Ansatz aus 50 ng pBluescript, 0,5 pmol blunt PCR-Produkt, 1x Ligase Puffer, 100 mM NaCl, 5 U EcoRI, 1 U T4 DNA Ligase in einem Volumen von 10 µl wurden 4-5 Stunden bei 22°C und anschließend 10 min bei 65°C inkubiert. Religierte pBluescript-Vektoren wurden durch Zugabe von 5 U EcoRI und 30-minütige Inkubation bei 37°C linearisiert bevor der Ansatz in *E. coli* transformiert wurde. 2TY<sub>amp</sub> Platten mit IPTG und X-Gal erlauben Blau-Weiß-Screening.

Alternativ kann das PCR Produkt mit SmaI in pUC18/19 kloniert werden. In diesem Fall wurde dem Ansatz kein NaCl zugegeben und die abschließende Inkubation vor der Transformation erfolgte bei 30°C.

#### **I.B.2.1.6. Kolonie-PCR**

Die Kolonie-PCR dient der schnellen Überprüfung einer großen Anzahl von *E. coli* Transformanten. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Einzelkolonie gepickt, an der Wand eines PCR-Tubes verstrichen und der Zahnstocher anschließend zum Animpfen von 2TY-Selektionsmedium verwendet. Nachdem die Zellen in 10 µl PCR-Mix (1x ThermoPol Puffer, 0,25 mM dNTPs, je 30 pmol Insert-spezifische Primer, 1U Taq Polymerase) aufgenommen wurden, folgte eine PCR mit 20 Zyklen.

#### **I.B.2.1.7. STET-Plasmidisolierung aus *E. coli* (87)**

*E. coli* Transformanten wurden in 3 ml 2TY-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden geerntet und durch kräftiges Vortexen in 500 µl STET-Puffer aufgenommen. Es wurden 100 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml in STET-Puffer) zugegeben, gemischt und die Ansätze für 2 min bei 95°C inkubiert. Ohne Abkühlung wurden die Proben für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das entstandene Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zur Fällung wurden 400 µl Isopropanol zugegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend 5 min zentrifugiert. Danach wurde die DNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und, nachdem der Überstand abgenommen wurde, in einer Speed-Vac getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl RNase A in TE (100 µg/ml) aufgenommen, 5 min unter Schütteln bei 65°C inkubiert und für 2 min zentrifugiert. Diese Methode liefert eine DNA-Konzentration von etwa 200 ng/µl.

DNA hoher Reinheit (für z.B. Sequenzierungsreaktionen) wurde mit dem QIAGEN Miniprep Kit isoliert.

#### **I.B.2.1.8. Transformation von *B. subtilis***

Die zu transformierenden *B. subtilis* Zellen wurden über Nacht in 3 ml LB-Selektionsmedium angezogen. Damit wurden 10 ml MNGE Medium mit 0,1% Casamino-säuren auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,3 wurden 10 ml vorgewärmtes MNGE Medium ohne Casamino-säuren zugegeben und die Zellen für eine weitere Stunde bei 37°C geschüttelt. In 15-ml Röhrchen wurden 400 µl der Kultur mit 0,1-1 µg DNA gemischt und für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl Expressionslösung (2,4% Hefeextrakt, 2,4% Casamino-säuren, 0,24 mg/ml L-Tryptophan) zugegeben und für eine weitere Stunde geschüttelt, bevor die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert wurden.

Um Dauerkulturen der kompetenten Zellen herzustellen, wurde die Kultur nach Zugabe von MNGE ohne Aminosäuren und der 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur geerntet. Der Überstand wurde in ein steriles Tube überführt und das Zellpellet in 1/8 des ursprünglichen Volumens resuspendiert. Nach Zugabe von Glycerin zu einer Endkonzentration von 10% wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **I.B.2.1.9. Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis***

Mit einer frischen Kolonie wurden 4 ml LB-Selektivmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die komplette Kultur wurde geerntet, die Zellen in 1,5 ml kaltem Resuspendierungspuffer aufgenommen und 2 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,7 ml Lysispuffer resuspendiert und zunächst 10 min auf Eis, anschließend 10 min bei 37°C inkubiert. Um die Protoplasten zu lysieren, wurden 25 µl N-Lauroyl-Sarkosin (30%) sowie 5 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubation bei 65°C für 20 min wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und vorsichtig gemischt. Es wurden 0,7 ml einer äquilibrierten Mischung von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Tube überführt und erneut mit 0,7 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurde erneut die obere Phase mit 50 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml (-20°C kaltem) 96%igem Ethanol 10 min auf Eis gefällt und für 10 min bei 14.000 x g pelletiert. Nachdem sie mit 500 µl (-20°C kaltem) 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Speed-Vac getrocknet wurde, wurde sie in 50 µl TE Puffer aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Bestimmung der Qualität und Quantität erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

#### **I.B.2.2. Proteinbiochemische Methoden**

##### **I.B.2.2.1. Isolierung der Membranfraktion von *B. subtilis***

Die *B. subtilis* Membranen wurden aus einer 40-ml Kultur isoliert. Dazu wurden die Zellen bei einer  $OD_{600} = 1,0$  geerntet (5 min, 3.800 x g, 4°C) und zweimal mit kaltem 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen. Das Pellet wurde (in einem Eppendorf-Tube) in 1 ml frischen, auf 37°C vorgewärmten, TMS-Puffer aufgenommen, mit 1 mM PMSF versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Protoplasten wurden kurz auf Eis abgekühlt und durch 2-minütige Zentrifugation (7.500 x g, 4°C) geerntet und in 1 ml Lysis-Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert. Der folgende Zellaufschluss durch Ultraschall (3 min, 50% Intervall, 60% Power) auf Eis lieferte den Gesamtprotein-Extrakt. Durch Zentrifugation (15 min, 110.000 x g, 4°C) wurde die Membranfraktion von der löslichen cytoplasmatischen Proteinfraction abgetrennt. Das Membranpellet wurde mit kaltem 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mithilfe eines Potter-Homogenisators gewaschen und in 50 µl dieses Puffers aufgenommen. Davon wurden standardmäßig 15 µl durch SDS-PAGE analysiert.

##### **I.B.2.2.2. Solubilisierung von Membranproteinen**

Die Membranproteine wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml solubilisiert. Dazu wurde das Pellet nach der ersten Abtrennung der Membranfraktion in 200 µl 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen und die Proteinkonzentration davon in einer 1:20 und 1:40 Verdünnung bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Membranpellet in dem entsprechenden Volumen an 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) homogenisiert. Der Solubilisierungsansatz enthielt 1% Triton X-100 bzw. 0,3% Digitonin, 150 mM NaCl und wurde für 30 min bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurden die nicht-solubilisierten Membranproteine abzentrifugiert (15 min, 110.000 x g, 4°C) und der Überstand (das Solubilisat) in ein frisches Tube überführt.

### **I.B.2.2.3. Affinitätschromatographie epitopmarkierter Proteine mit Avidin, IgG-Sepharose, Ni-NTA Agarose und Protein A-Sepharose**

Zur Reinigung über **monomeres Avidin** wurden alle Puffer mit 0,1% Digitonin versetzt. 100 µl Matrix mit 400 µl PBS (pH 7), 300 µl Blockierungs/Elutionspuffer (2 mM D-Biotin in PBS), 600 µl Regenerierungspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,8) und zuletzt mit 400 µl PBS gewaschen. Das monomere Avidin wurde für 20 min mit dem Solubilisat bei 4°C geschwenkt und in ein Mobicol-Säulchen überführt. Nach Auffangen des Durchlaufs wurde die Matrix zweimal mit 600 µl PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden zunächst mit 80 µl Blockierungs/Elutionspuffer und anschließend mit 80 µl 1x SDS-Probenpuffer (auf 95°C vorgewärmt) und 5 min Inkubation bei 95°C eluiert. Je 3 µl von Solubilisat und Durchlauf und 12 µl der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert und mit Streptavidin-Peroxidase und Penta-His Antikörper detektiert.

Vor der Inkubation mit dem Solubilisat wurde eine entsprechende Menge **IgG-Sepharose**, deren Bindekapazität etwa 2 mg/ml beträgt, dreimal abwechselnd mit je 300 µl 0,5 M HAc (pH 3,4) und Puffer TS (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen und dazwischen bei minimaler Beschleunigung für 10 sec pelletiert. Der pH-Wert des Überstandes sollte nach dem letzten Waschschrift im neutralen Bereich liegen. Das Solubilisat wurde mit der IgG-Sepharose für 2-3 h bei 4°C geschwenkt. Die anschließenden Wasch- und Elutionsschritte wurden in Mobicol-Säulchen durchgeführt, die für 1 min bei 2.500 x g zentrifugiert wurden, um die jeweilige Fraktion zu erhalten. Nachdem der Durchlauf aufgefangen wurde, wurde insgesamt dreimal mit 200 µl TST (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 8,0) sowie einmal mit 300 µl 5 mM NH<sub>4</sub>Ac (pH 5,0) gewaschen und mit 300 µl 0,5 M HAc (pH 3,4) eluiert. Die Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, über Nacht lyophilisiert und für die anschließende Analyse durch SDS-PAGE in 20 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Detektion erfolgte mit anti-Rabbit Horseradish Peroxidase Konjugat (1:5000).

Mit einem His-Epitop versehene Proteine wurden mithilfe einer **Ni-NTA Matrix** (QIAGEN) gereinigt. Unter der Annahme einer Bindekapazität von 5 mg/ml wurde die entsprechende Menge zweimal mit dem Elutionspuffer, der kein Imidazol enthielt, gewaschen. Das Solubilisat wurde mit der Matrix für 30 min bei 4°C geschwenkt. Die Matrix wurde anschließend in Mobicol-Säulchen überführt und mit 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl (0,1% Triton bzw. 0,1% Digitonin im Fall von Membranproteinen) mehrmals gewaschen. Die Elution erfolgte mit Waschpuffer, der 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 und 200 mM Imidazol (sowie 0,01% Triton bzw. 0,01% Digitonin) enthielt. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden zusammen mit dem Zellextrakt bzw. der Membranfraktion und dem Solubilisat sowie dem Durchlauf durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Penta-His Antikörper (mouse), gefolgt von Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (A9044) detektiert.

Zur Reinigung von HA-markiertem YpaA mit **Protein A-Sepharose** wurde das Solubilisat der Membranproteine mit einer 1:20 Verdünnung des polyklonalen Antikörpers (HA-probe (Y-11), sc-805) versetzt und eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Die entsprechende Menge an lyophilisierter Protein A-Sepharose wurde in Wasser aufgenommen (nicht vortexen) und zweimal mit Wasser und einmal mit Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05% DDM, pH 7,0) gewaschen. Anschließend wird das Solubilisat/Antikörper-Gemisch zur Protein A-Sepharose gegeben und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Die Matrix wurde in Mobicol-Säulchen überführt und dreimal mit dem oben genannten Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 1x SDS-Probenpuffer, der auf 95°C vorgewärmt war, und einer 5-minütigen Inkubation bei 95°C.

### **I.B.2.2.4. Proteinbestimmung nach Bradford (26)**

Die 1x Bradford-Färbelösung wurde zu je 1 ml zusammen mit 90 µl Wasser in Plastikkuvetten vorgelegt. Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wurden 10 µl BSA-Lösungen (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/ml) bzw. Wasser eingesetzt, die Ansätze durch mehrfaches Invertieren gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensität der Farbreaktion wurde photometrisch bei 595 nm



ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Lösung erfolgte ebenfalls mit einem Volumen von 10 µl.

Die BSA-Stammlösung wurde hergestellt, indem BSA (Bovine Serum Albumin, Fraktion V) zu etwa 10 mg/ml in Wasser gelöst wurde. Anschließend wurde die Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette bestimmt und mithilfe des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{(10 \text{ mg/ml})} = 6,67$  die tatsächliche Konzentration berechnet, die dann auf 1 mg/ml eingestellt wurde. Es ist gilt zu beachten, dass Detergenzien (Triton X-100 und SDS) die Farbreaktion stören und eine entsprechende Kontrolle von den Messwerten abgezogen werden muss.

#### I.B.2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

Die Analyse von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (132). Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Wet-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (30 min, 360 mA) und anschließend reversibel mit der Ponceau S Färbelösung angefärbt, um den Proteinstandard und die Spuren zu kennzeichnen. Die Membran wurde durch dreimal 10-minütiges Waschen mit Blockierungspuffer (1% Milchpulver in 1x PBS, 0,1% Tween-20) abgesättigt. Dabei war darauf zu achten, dass die Färbelösung komplett entfernt wurde, da durch das saure Milieu ansonsten die Antikörperbindung beeinträchtigt werden konnte. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper geschwenkt, anschließend dreimal für 10 min mit Blockierungspuffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (in Blockierungspuffer) überschichtet. Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Blot ein letztes Mal gewaschen (3x 10 min) und kurz in 1x PBS geschwenkt, um Rest des Milchpulvers abzuwaschen. Die Detektion erfolgte mit den selbst gemachten Chemilumineszenz-Lösungen bzw. dem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce).

		Verdünnung Inkubationszeit			Verdünnung Inkubationszeit
Primärer Antikörper	HA-probe (Y-11): sc-805 (rabbit polyclonal antibody)	1:2500 über Nacht	Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (goat)	1:5000 1 Stunde
	Anti-Alkaline phosphatase [ <i>E. coli</i> ] in rabbit, IgG fraction				
	Penta-His Antikörper	1:2500 über Nacht		Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (A9044)	1:5000 1 Stunde
	Anti-GFP, mouse IgG, monoclonal 11E5				
Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugated		1:2500 1 Stunde			

#### I.B.2.2.6. Analyse von Proteinbanden im SDS-Gel mittels Massenspektroskopie

Alle für die Analyse benötigten Lösungen wurden frisch und mit analysenreinen Chemikalien hergestellt. Das SDS-Gel wurde für 30 min in Coomassie-Lösung gefärbt und für 2-3 Stunden mit 7% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurde das Gel für 1 Stunde gewässert und über Nacht in frischem Wasser geschwenkt. Die zu analysierenden Banden wurden mit frischen Skalpellklingen ausgeschnitten, ihr Volumen abgeschätzt und in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von 1 mm zerschnitten (nicht zerdrücken). Als Negativkontrolle wurde ein ähnlich großes Gelstück an einer Stelle ausgeschnitten, an der kein Protein zu sehen ist. Die Gelwürfel wurden unter sanftem Schütteln für 30 min bis zu 2 Stunden nacheinander in je 200 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /25% Acetonitril, 25% Acetonitril und schließlich 50 % Acetonitril extrahiert. Nach Lyophilisierung der Gelstücke wurden sie über Nacht mit Trypsin verdaut (Endkonzentration 2 µg Trypsin/100 µl

Gelvolumen). Insgesamt wurde als Puffer 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in der 1,5fachen Menge des ursprünglichen Gelvolumens zugegeben, allerdings in zwei gleichen Portionen. Zuerst wurden die Gelwürfel in der Hälfte des Puffers mit der gesamten Proteasemenge aufgenommen und für 5 min inkubiert, damit die Protease vollständig von den Gelstücken aufgenommen wurde. Anschließend wurde der restliche Puffer ohne Protease zugegeben (bei einem Gelvolumen von weniger als 10  $\mu\text{l}$  wurde die Proteaselösung in einem Schritt zugegeben). Nach dem Trypsinverdau wurden die Gelwürfel zweimal mit 100  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und einmal mit 100  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /Acetonitril (1:1) für je 1-2 Stunden extrahiert. Nachdem die Extrakte vereinigt und lyophilisiert wurden, wurde der trockene Rückstand in 200  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und noch einmal lyophilisiert, um mögliche  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Reste zu entfernen. Die weitere Analyse wurde von Herrn Prof. Dr. R. Deutzmann und E. Hochmuth (Lehrstuhl für Biochemie I, Universität Regensburg) durchgeführt.

### I.B.2.2.7. Analyse der Fusionsproteine YpaAX-GFP, YpaAX-LacZ und YpaAX-PhoA

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden *B. subtilis* Zellen, die ein leeres pDG148-Stu Plasmid oder die Überexpressionsplasmide pDG148-*ypaAX-gfp/lacZ/phoA* enthielten, über Nacht in LB/Phleomycin angezogen. Damit wurden zwei LB/Phleomycin Hauptkulturen mit 0,5 mM IPTG auf  $\text{OD}_{600} = 0,15$  angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine  $\text{OD}_{600}$  von etwa 1,0 erreicht war. Mit der einen wurden nachfolgende Analysen durchgeführt, aus der anderen wurde die Membranfraktion isoliert und die Expression der Fusionsproteine mittels Western Blot untersucht.

Zur Bestimmung der **GFP Fluoreszenz** wurden die Zellen in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 15 mM EDTA (pH 8,0) gewaschen und zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,9$  in diesem Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte mit dem Fluorimeter Fluoromax-2, in dem GFP bei 488 nm angeregt und seine Emission bei 512 nm aufgezeichnet wurde.

Der **LacZ Flüssigtest** wurde nach der Methode von Miller et al. (170) durchgeführt. Von jeder Kultur wurden 3-ml Aliquots geerntet (1 min, 14.000 x g, 4°C) und nach Abnahme des kompletten Überstandes nochmals zentrifugiert, um das restliche Medium zu entfernen. Die Pellets wurden nun entweder weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden in 400  $\mu\text{l}$  1x Z-Puffer/50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol/0,5% LD-Mix resuspendiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Für die Nullprobe wurde nur Puffer ohne Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die Proben 20 sec beschallt (50% Intervall, 60% Power), 100  $\mu\text{l}$  dieses Zellaufschlusses mit 700  $\mu\text{l}$  1x Z-Puffer/50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol gemischt und für 5 min bei 28°C äquilibriert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG, 4 mg/ml in 1x Z-Puffer) gestartet und bei einsetzender Gelbfärbung bei einer der Proben mit 500  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  abgestoppt. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation wurde die Absorption bei 420 nm vermessen.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford wurden 20  $\mu\text{l}$  der Proben eingesetzt. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität errechnete sich mit der Formel:

$$\text{Units/mg Protein} = \frac{1500 \times A_{420}}{\Delta t \times V \times A_{595} \times 1,7}$$

Dabei ist  $V$  das eingesetzte Volumen des Zellextraktes,  $A_{595} \times 1,7$  der Proteingehalt des Extraktes in mg/ml,  $\Delta t$  die Zeitdauer in min vom Start bis zum Abstoppen der Reaktion und  $A_{420}$  die Absorption von ortho-Nitrophenol bei 420 nm.

Für den **LacZ-Overlay Test** wurden die *B. subtilis* Stämme mit den Plasmiden pDG148-*ypaA5-lacZ* und pDG148-*ypaA4-lacZ* zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,06$  in sterilem Wasser resuspendiert und 5  $\mu\text{l}$  davon auf eine SP/Phleomycin Platte aufgetropft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden sie mit der Overlay-Lösung überschichtet und bei 30°C weiter inkubiert, bis sich die Blaufärbung entwickelte.

Der **PhoA Test** wurde wie von Manoil (154) beschrieben durchgeführt. Zehn Minuten vor der Entnahme von je 3 ml Zellen, wurden die Kulturen mit 1 mM Iodacetamid versetzt, um die Aktivierung cytosolisch orientierter Alkalischer Phosphatase zu verhindern. Ebenso enthielten alle nachfolgenden Puffer dieses Reagenz. Die Zellen wurden mit kaltem 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)/10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen und in 1 ml kaltem 1 M Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen. Die Bestimmung der OD<sub>600</sub> erfolgte mit einer 1:5 Verdünnung der Zellen in kaltem 1 M Tris/HCl (pH 8,0). 100 µl der Zellen bzw. 100 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,0) für den Leerwert wurden mit 900 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,0)/0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> gemischt und für 5 min bei 37°C äquilibriert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,4% p-Nitrophenylphosphat (in 1 M Tris/HCl (pH 8,0)) gestartet. Als bei einer der Proben die Gelbfärbung einsetzte wurde die Zeit notiert, alle Ansätze mit 120 µl 0,8 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M EDTA (pH 8,0) versetzt und in einem Eis/Wasserbad abgekühlt, um die Reaktion abzustoppen. Die in den Proben enthaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Absorption des Überstandes bei 420 und 550 nm gegen den Leerwert ermittelt. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Units activity} = \frac{[OD_{420} - (1,75 \times OD_{550})] \times 1000}{\Delta t \times OD_{600} \times V}$$

wobei  $\Delta t$  die Zeitdauer in min zwischen Start und Abstoppen der Reaktion und  $V$  das eingesetzte Volumen an Zellen in ml ist.

### I.B.2.2.8.      **Aufnahmetests mit [<sup>14</sup>C]Riboflavin und [<sup>14</sup>C]Fruktose**

*B. subtilis* Zellen wurden in CSEG Medium, *E. coli* Zellen in M9 Minimalmedium unter Selektionsbedingungen über Nacht angezogen. Die Hauptkulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> = 0,15 angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 erreicht ist. *B. subtilis* Zellen wurden zu diesem Zeitpunkt bei 4°C geerntet, die *E. coli* Kulturen wurden durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und für weitere drei Stunden inkubiert (bis OD<sub>600</sub> = 0,8). Nach dem Ernten wurden die Zellen mit kaltem Wasser und kaltem Transportpuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0), 50 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und anschließend in Transportpuffer zu einer OD<sub>600</sub> von 10/ml aufgenommen und auf Eis aufbewahrt. Das Testvolumen enthielt 500 µl Zellen (OD<sub>600</sub> = 2,5-5), die in einem 30°C-Wasserbad gerührt wurden. Um die Zellen zu energetisieren, wurde dem Ansatz nach zwei Minuten Glukose zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach einer weiteren Minute Inkubation wurde der Aufnahmetest durch Zugabe von [<sup>14</sup>C]Riboflavin gestartet, so dass die Substratkonzentration im Test 1,6 µM (YpaA) bzw. 2,2 µM (RibM) betrug. Über drei oder vier Minuten wurden 70-µl Aliquots entnommen, die Zellen auf GN-6 Metrical Membranen (Porengröße 0,45 µm) abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Die Radioaktivität in den Zellen wurde mithilfe eines Flüssig-Szintillationszählers bestimmt.

Um die Aufnahme von Fruktose in *B. subtilis* zu messen, wurden die Zellen in CSE angezogen, dem anstelle von Glukose Sorbitol als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Das Substrat für diesen Test war eine Mischung aus D-[U-<sup>14</sup>C]Fruktose und nicht-markierter Fruktose, deren Endkonzentration 58 µM betrug.

### I.B.2.3.      **Sonstige Methoden**

#### I.B.2.3.1.      **Anzuchsbedingungen und Dauerkulturen**

Flüssigkulturen von *E. coli* und *B. subtilis* wurden in einem 37°C-Luftschüttler aerob angezogen. Auf Platte wurden sie über Nacht bei 37°C, *B. subtilis* tagsüber auch bei 42°C inkubiert. Bevor das Minimalmedium CSE(G) mit *B. subtilis* angeimpft werden konnte, musste der jeweilige Stamm über Nacht/tagsüber frisch auf einer SP-Selektivplatte ausgestrichen werden. Auf diesem Vollmedium keimen entstandene Sporen aus, die in Minimalmedium nicht anwachsen würden. Dauerkulturen

wurden durch Zugabe von 50% Glycerin zu frischen Übernachtskulturen in LB-Selektivmedium hergestellt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **I.B.2.3.2. Wachstumstests**

Um das Wachstum von *E. coli* und *B. subtilis* auf verschiedenen Bedingungen zu testen, wurden frisch ausgestrichene Zellen in sterilem Wasser zu einer OD<sub>600</sub> von 0,06 resuspendiert. Davon wurden 5 µl (ungefähr 50.000 Zellen) auf die entsprechende Platte aufgetropft. Nach einer Inkubation von 1-2 Tagen bei 37°C wurde das Wachstum dokumentiert.

#### **I.B.2.3.3. Bestimmung der Konzentration des sezernierten Riboflavins durch Fluoreszenzanalyse**

Die zu untersuchenden, Riboflavin-überproduzierenden *B. subtilis ribC1* Stämme wurden über Nacht in MNGE+CAA unter selektiven Bedingungen angezogen. Ein Volumen von 15 ml vorgewärmtes MNGE+CAA Medium wurde auf eine OD<sub>600</sub> = 0,15 angeimpft. Dazu wurde die nötige Menge der Übernachtskultur geerntet und mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen, um das mit Riboflavin angereicherte Medium zu entfernen. Die Zellen wurden unter selektiven und wo nötig induzierenden (0,5 mM IPTG) Bedingungen bei 37°C geschüttelt. Jede Stunde wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und ein 400-µl Aliquot entnommen, pelletiert und der Überstand bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität in den Kulturüberständen erfolgte mit dem Fluorometer Fluostar optima (BMG Labtech, Lehrstuhl Prof. Dr. O. Wolfbeis) im 96-well Format. Zur Berechnung der Riboflavinkonzentration wurde eine Konzentrationsreihe mit 540 µM, 54 µM, 5,4 µM, 540 nM, 54 nM und 5,4 nM mitgeführt. (Einstellungen: 25°C, maximale Intensität betrug 90% der Fluoreszenz der 54 µM Riboflavinlösung)

#### **I.B.2.3.4. Nachweis von [<sup>14</sup>C]Riboflavin durch Autoradiographie**

SDS-Gele bzw. DC-Platten wurden auf einem Multipurpose-Screen exponiert. Die Auswertung des Autoradiogramms erfolgte mithilfe eines Phosphorimagers.

## **I.C. Ergebnisse**

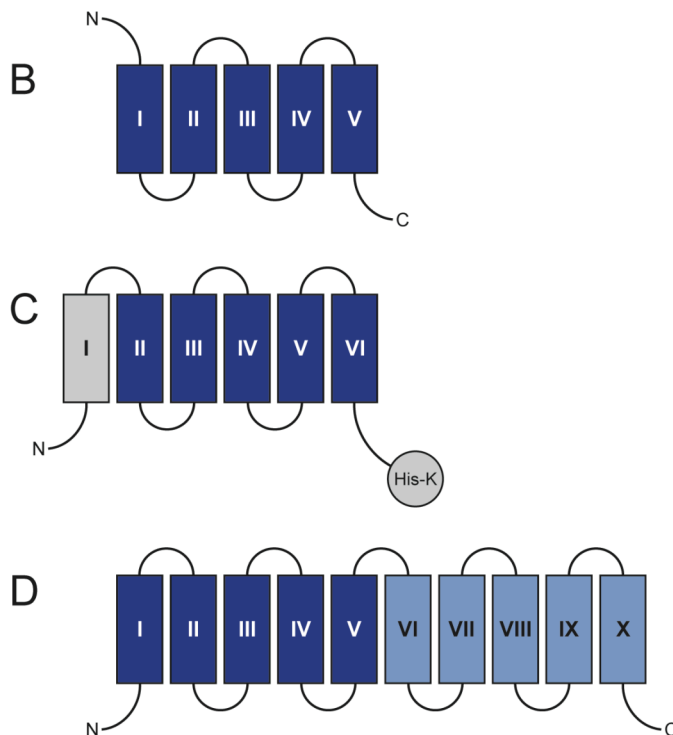
### **I.C.1. Die Charakterisierung des Riboflavintransporters YpaA aus *Bacillus subtilis***

#### **I.C.1.1. *In silico* Analyse von YpaA, einem Mitglied der Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter (BART) Superfamilie**

Die Expression von *ypaA* unterliegt der Kontrolle durch ein konserviertes RFN-Element im 5'-Promotorbereich, weshalb für sein Genprodukt eine mögliche Rolle im Riboflavinstoffwechsel postuliert wurde (68, 263). Es kodiert für ein Protein mit 190 Aminosäuren, wovon 119 Aminosäuren (63%) fünf putative Transmembranhelices bilden. Basierend auf der Aminosäuresequenz von YpaA wurde die Superfamilie der Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter (BART) identifiziert (156), die sich aus den Familien der Riboflavintransporter (RFT), Gallensalz:Na<sup>+</sup>-Symporter (Bile Acid:Na<sup>+</sup>-Symporter, BASS), Arsenical Resistance-3 Proteine (Acr3), Sensor Histidin Kinasen (SHK) und Kinasen/Phosphatasen/Synthetasen/Hydrolasen (KPSH) zusammensetzt. Obwohl sich die einzelnen Vertreter in ihrer Primärstruktur untereinander nicht sehr stark ähneln, weisen sie eindeutige Homologie in der Abfolge und Sequenz der hydrophoben Bereiche auf: Die Mitglieder der Superfamilie besitzen fünf (RFT), sechs (SHK) oder zehn (Acr3) Transmembrandomänen (TMD). Dabei ist die 5-TMD Einheit von YpaA homolog zu den TMDs 2-6 der SHK-Familie und den TMDs 1-5 sowie 6-10 der Acr3-Familie, die demnach vermutlich durch Verdopplung entstanden ist (156). Da sich bei Vertretern der Sensor Histidin Kinasen nach der sechsten TMD eine cytoplasmatische, katalytische Domäne anschließt, müsste der C-Terminus von YpaA aufgrund der Homologie ebenfalls cytoplasmatisch und damit der N-Terminus extrazellulär orientiert sein (zur Veranschaulichung siehe Abb. 1.8 B-D).

Sehr viele Vertreter der Gram-positiven Bakterien, wie *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Clostridium perfringens*, besitzen Homologe zu YpaA, deren Expression ebenfalls durch ein RFN-Element reguliert wird (263). RibU aus *Lactococcus lactis* ist zu 28% mit YpaA identisch und das einzige Protein, das bislang funktionell als Riboflavintransporter charakterisiert wurde (Abb. 1.8 A, (30)). Eine, wenn auch sehr schwache Ähnlichkeit besteht zwischen YpaA und membranlokalisierten Komponenten von Phosphotransferasesystemen.

A	<i>B_subtilis</i>	1	-----MKVKKIVVVSMLSSIAFVLM--LNFPPFGPDVNLKIDFSDVPALIAILLVCPAGIAYEAIKNVLYITQSSMAG	1	-----MKVKKIVVVSMLSSIAFVLM--LNFPPFGPDVNLKIDFSDVPALIAILLVCPAGIAYEAIKNVLYITQSSMAG
	<i>B_cereus</i>	1	---M-KQKNSIVQVSVSAMLSSIAFVLLMM--LDFFPPGPPFLKIDFSDVPALIAAIFGPAAGIIVBAIKNLLHITQSSLTG	1	---M-KQKNSIVQVSVSAMLSSIAFVLLMM--LDFFPPGPPFLKIDFSDVPALIAAIFGPAAGIIVBAIKNLLHITQSSLTG
	<i>C_perfringens</i>	1	---MKTKLTNTNRFIKLSLSAIAFVLLMY--LDFFVTPFPFLKIDFSDVPALMGAFAPGPAAGIITELMKNLLIITVKGITGTG	1	---MKTKLTNTNRFIKLSLSAIAFVLLMY--LDFFVTPFPFLKIDFSDVPALMGAFAPGPAAGIITELMKNLLIITVKGITGTG
	<i>L_lactis</i>	1	-----MSKTERNVLIAMLAALSTLLPILQFPPLPGIDFMKVELSIIPVLIGVFTLGLGDGFIHLFIHSVLWYLLFNQGPS	1	-----MSKTERNVLIAMLAALSTLLPILQFPPLPGIDFMKVELSIIPVLIGVFTLGLGDGFIHLFIHSVLWYLLFNQGPS
	<i>L_acidophilus</i>	1	MDKLKTGVNSITNTIAYALIGCIAFVVMK--FSFPPIPGVGLKEDFSDVITITIGMTFCAIPGIVIALIRMIISLITFEFATP	1	MDKLKTGVNSITNTIAYALIGCIAFVVMK--FSFPPIPGVGLKEDFSDVITITIGMTFCAIPGIVIALIRMIISLITFEFATP
	<i>L_salivarius</i>	1	-----MRNVSIKRYAIIACIAAIIYLLMF--TSFVAPIVPVMKVDFADEPILIGFVLCVSGEGEAVLRSVLYLITITGPSIA	1	-----MRNVSIKRYAIIACIAAIIYLLMF--TSFVAPIVPVMKVDFADEPILIGFVLCVSGEGEAVLRSVLYLITITGPSIA
	<i>L_salivarius</i>	1	-----MKNYSMKVFVSVALGTLAFILMM--LQFPPIPSAPFLKIDFSDIPALIGGLIFGPAAGIIVLVELIKNVLLYIVGSPVG	1	-----MKNYSMKVFVSVALGTLAFILMM--LQFPPIPSAPFLKIDFSDIPALIGGLIFGPAAGIIVLVELIKNVLLYIVGSPVG
	<i>S_aureus</i>	1	-----MQQNKRLITISMLSAIAFVLTTF--KFPPIPPPPVLTIDFSDVPSLLATFDFGPAAGIIVVALIKNLLNYLIFS--MG	1	-----MQQNKRLITISMLSAIAFVLTTF--KFPPIPPPPVLTIDFSDVPSLLATFDFGPAAGIIVVALIKNLLNYLIFS--MG
	<i>B_subtilis</i>	75	VPVGVANFIACCLFIFLETAFLFKKL---NSAK---GFAVSLLLGTAAMTILMSILNYVLLIPAYTW--FLHSPALSD---	75	VPVGVANFIACCLFIFLETAFLFKKL---NSAK---GFAVSLLLGTAAMTILMSILNYVLLIPAYTW--FLHSPALSD---
	<i>B_cereus</i>	79	VPVGEIANFIACCLFIFGPAALFRKY---RVVK---STTGLMLGTITMALIMSVLNYITIFPAYTW--FLNSPAMS---	79	VPVGEIANFIACCLFIFGPAALFRKY---RVVK---STTGLMLGTITMALIMSVLNYITIFPAYTW--FLNSPAMS---
	<i>C_perfringens</i>	79	F-VGEIANFLVGVALVWPAALVYKKN---KUKK---TALIGVLCVLCHEVVGIANVYVILLPAYCM--A-----MSK---	79	F-VGEIANFLVGVALVWPAALVYKKN---KUKK---TALIGVLCVLCHEVVGIANVYVILLPAYCM--A-----MSK---
	<i>L_lactis</i>	78	TWEGVPMNFVALGIFMAIVWEFTKKK---FSIK---NYTVGIVLTIASVLLVMMMLNVFAYLELVRDAAGFDVKI-----F	78	TWEGVPMNFVALGIFMAIVWEFTKKK---FSIK---NYTVGIVLTIASVLLVMMMLNVFAYLELVRDAAGFDVKI-----F
	<i>L_acidophilus</i>	83	SVLGEIAAFIATMSFSLFFYILSNITQENRRTKVGRKPIILGLITGILAMTCHIALANAFILTPAYAVTAVPNITINSYGAL	83	SVLGEIAAFIATMSFSLFFYILSNITQENRRTKVGRKPIILGLITGILAMTCHIALANAFILTPAYAVTAVPNITINSYGAL
	<i>L_salivarius</i>	78	SLGIGTNIILATITICLPMYILHEK---HDLK---RYIIATVVSITISLTFWLSIGNLWVITPLVMA--VLGMK-----	78	SLGIGTNIILATITICLPMYILHEK---HDLK---RYIIATVVSITISLTFWLSIGNLWVITPLVMA--VLGMK-----
	<i>L_monocytogenes</i>	78	VPVGEIANFISGLFYVLIYILHWL---RSTK---GAVLSTAVCTVIMTGAAVENYFVLEFFYIK--LGGFAND---	78	VPVGEIANFISGLFYVLIYILHWL---RSTK---GAVLSTAVCTVIMTGAAVENYFVLEFFYIK--LGGFAND---
	<i>S_aureus</i>	73	DPVGPANFLACASTFLTANATVKNK---RSTK---SLITGLITATIVMTIVSILNYFVLELLVGM--IFNLADIAN---	73	DPVGPANFLACASTFLTANATVKNK---RSTK---SLITGLITATIVMTIVSILNYFVLELLVGM--IFNLADIAN---
	<i>B_subtilis</i>	145	-----SALKTAVVAGILPFPNMIKGIIVTVFSLFI---KLKFWIE-----QORSAHIH-	145	-----SALKTAVVAGILPFPNMIKGIIVTVFSLFI---KLKFWIE-----QORSAHIH-
	<i>B_cereus</i>	149	-----EAKTKTVVTAIPFPNLIKGIIVTVFVAFS---RLKVVWF-----AKMKN--A-	149	-----EAKTKTVVTAIPFPNLIKGIIVTVFVAFS---RLKVVWF-----AKMKN--A-
	<i>C_perfringens</i>	144	-----AEIMQVTVGLIPFNGIKSILVCGHTYALYK---KVSVSIFKV-EPMLDKPKQ--MKENL-G	144	-----AEIMQVTVGLIPFNGIKSILVCGHTYALYK---KVSVSIFKV-EPMLDKPKQ--MKENL-G
	<i>L_lactis</i>	149	AGATHLFNMGSL-SVTLPNTYLLTVLPFNALQYIIFAVVGLVLT---VFKKNK-----VVF--YNA-	149	AGATHLFNMGSL-SVTLPNTYLLTVLPFNALQYIIFAVVGLVLT---VFKKNK-----VVF--YNA-
	<i>L_acidophilus</i>	167	YHFTKVVYLGQLHLPSYSTYFHSIIIPFNLIKIIINAVIYLFEATIKTIKPPVR-----KFKLL--N	167	YHFTKVVYLGQLHLPSYSTYFHSIIIPFNLIKIIINAVIYLFEATIKTIKPPVR-----KFKLL--N
	<i>L_salivarius</i>	144	-----LT-LPISQLVLYGVLFPNLIKGIIVGTIVFLYA---KIHVWLDNKANEFALAE--TKTIS--I	144	-----LT-LPISQLVLYGVLFPNLIKGIIVGTIVFLYA---KIHVWLDNKANEFALAE--TKTIS--I
	<i>L_monocytogenes</i>	148	-----VAWLITYYIIPFNLIKGIIVAVFILLYS---RLKRWIAKN-QTMKERRKFERRQOEISH	148	-----VAWLITYYIIPFNLIKGIIVAVFILLYS---RLKRWIAKN-QTMKERRKFERRQOEISH
	<i>S_aureus</i>	143	-----N-IPKVIIVSGIIPFNLIKGIIVISIVILLYR---RLANFIKRI-----	143	-----N-IPKVIIVSGIIPFNLIKGIIVISIVILLYR---RLANFIKRI-----

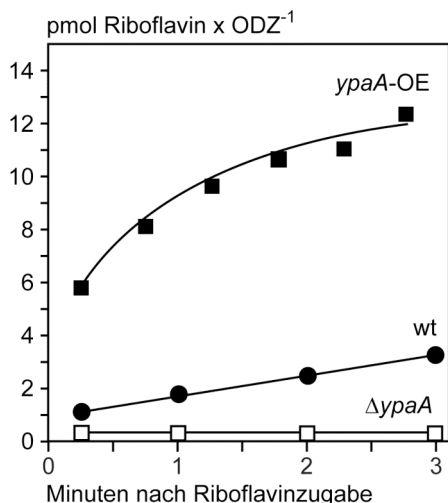


**Abb. 1.8. YpaA-Homologe.** (A) Sequenz-Vergleich von *B. subtilis* YpaA mit homologen Proteinen aus *B. cereus* (gi47569154; 59,3% Identität), *C. perfringens* (gi18311149; 30,4%), *L. lactis* (gi66270063; 27,9%), *Lactobacillus acidophilus* (gi58254579; 23,1%), *Lactobacillus salivarius* (gi90961914; 24,5%), *Listeria monocytogenes* (gi16803984; 40%), *S. aureus* (gi15924475; 42,4%). Die von TMPred vorgeschlagenen, putativen Transmembranhelices von YpaA sind durch horizontale Linien gekennzeichnet. (B-D) Die BART-Familie. Die 5-TMD Einheit von YpaA (dunkelblau) bildet das konservierte Strukturelement der Familie der Riboflavin-transporter (RFT, B), der Sensor Histidin Kinasen (SHK, C) und der Arsenical Resistance-3 Familie (Acr3, D), die durch Verdoppelung der 5-TMD Einheit entstanden ist (156).

### I.C.1.2. YpaA vermittelt Riboflavintransport in *B. subtilis*

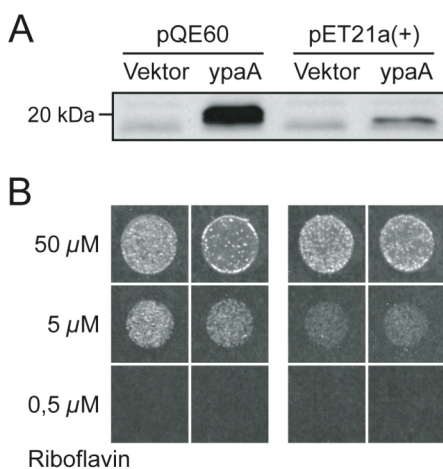
Um eine Beteiligung von YpaA am Riboflavintransport nachzuweisen, wurde eine  $\Delta ypaA::Km^r$  Mutante sowie ein Überexpressionsplasmid für *ypaA* (pDG148-Stu-*ypaA*) erzeugt. Während der Wildtyp in Aufnahmetests mit [ $^{14}C$ ]Riboflavin eine mäßige Transportaktivität zeigte, war der  $\Delta ypaA$  Stamm nicht in der Lage, Riboflavin zu transportieren. Die Überexpression von *ypaA* hingegen führte

zu einer gesteigerten Aufnahmeaktivität, deren Messwerte bereits zu Beginn des Experiments um ein Vielfaches höher lagen als beim Wildtyp (Abb. 1.9). Der Grund dafür mag in der hohen Affinität von YpaA zu Riboflavin liegen. Das starke Bindevermögen von Riboflavin konnte sowohl für den Riboflavintransporter RibU aus *L. lactis* als auch für ein Riboflavin-Bindeprotein aus der Membranfraktion von *B. subtilis* nachgewiesen werden, welches sehr wahrscheinlich mit YpaA identisch ist (30, 34).



**Abb. 1.9. YpaA ist an der Riboflavinaufnahme in *B. subtilis* beteiligt.** Die Aufnahmeaktivität für Riboflavin von Wildtyp (●) wurde verglichen mit Wildtyp Zellen, die ein Plasmid zur Überexpression von *ypaA*-OE enthielten (■) oder in denen *ypaA* deletiert war ( $\Delta ypaA::Km^r$ , □). Dazu wurden die Stämme in Riboflavin-freiem CSEG angezogen und in Transportpuffer (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 50 mM  $MgCl_2$ , pH 7) resuspendiert. Nach Energetisierung der Zellen mit 1 mM Glukose wurde der Test durch Zugabe von [ $^{14}C$ ]Riboflavin (Endkonzentration 1,6  $\mu M$ ) gestartet. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, abgefiltert und mit Wasser gewaschen. Die aufgenommene Radioaktivität wurde durch Flüssig-Szintillationsmessung bestimmt.

Die heterologe Expression von *ypaA* in *E. coli* wurde mit den beiden Überexpressionsplasmiden pQE60-*ypaA*-6His und pET21a(+)-*ypaA*-6His untersucht. *E. coli* besitzt kein Transportsystem für Riboflavin, ist also auf seine Biosynthese angewiesen (4). Ist YpaA funktionell, sollte es das Wachstum der riboflavinauxotrophen Biosynthesemutante BSV11 auf niedrigen Riboflavinkonzentrationen verbessern. Die Expression von *ypaA* in BSV11 wurde durch Western Blot Analyse untersucht. Mit dem Plasmid pQE60-*ypaA*-6His war eine sehr starke, mit pET21a(+)-*ypaA*-6His eine schwächere Expression von *ypaA* zu sehen (Abb. 1.10 A).



**Abb. 1.10. *ypaA* wird in *E. coli* exprimiert, ist aber nicht funktionell.** (A) Die riboflavinauxotrophe Mutante BSV11 wurde mit den leeren Vektoren pQE60 und pET21a(+) (Vektor) bzw. den Plasmiden pQE60-*ypaA*-6His und pET21a(+)-*ypaA*-6His (*ypaA*) zur Überexpression von *ypaA* transformiert und in 2TY mit 25  $\mu M$  Riboflavin und 0,5 mM IPTG angezogen. Die Detektion des jeweils 6His-markierten *ypaA* erfolgte durch Western Blot Analyse mit einem Penta-His mouse monoklonalen Antikörper. (B) Das Riboflavinbedürfnis der entsprechenden Stämme wurde auf M9 Minimal Medium getestet, das verschiedene Riboflavinkonzentrationen enthielt. Je  $5 \times 10^4$  Zellen wurden auf die Platten aufgetragen, die für 24 Std. bei 37°C inkubiert wurden.

In Aufnahmetests mit [<sup>14</sup>C]Riboflavin und *ypaA*-exprimierenden *E. coli* Zellen war ein minimaler Anstieg der Radioaktivität in den entnommenen Proben über die Zeit zu sehen (Daten nicht gezeigt). Allerdings handelte es sich dabei nicht um einen stoffwechselabhängigen Prozess, da die Zellen dasselbe Verhalten zeigten, wenn der Test bei 4°C durchgeführt wurde. Die Funktionalität von YpaA wurde durch Wachstumstests auf M9 Minimalmedium mit absteigendem Riboflavingehalt überprüft. Keines der beiden Plasmide war in der Lage, Wachstum auf geringeren Riboflavinkonzentrationen zu vermitteln (Abb. 1.10 B). Somit gelang der Nachweis der Riboflavinaufnahme durch YpaA nur in seinem natürlichen Wirtsorganismus *B. subtilis*, nicht aber nach heterologer Expression in *E. coli*.

### **I.C.1.3. Die Aufnahme von Riboflavin erfolgt nicht über ein neuartiges Phosphotransferasesystem**

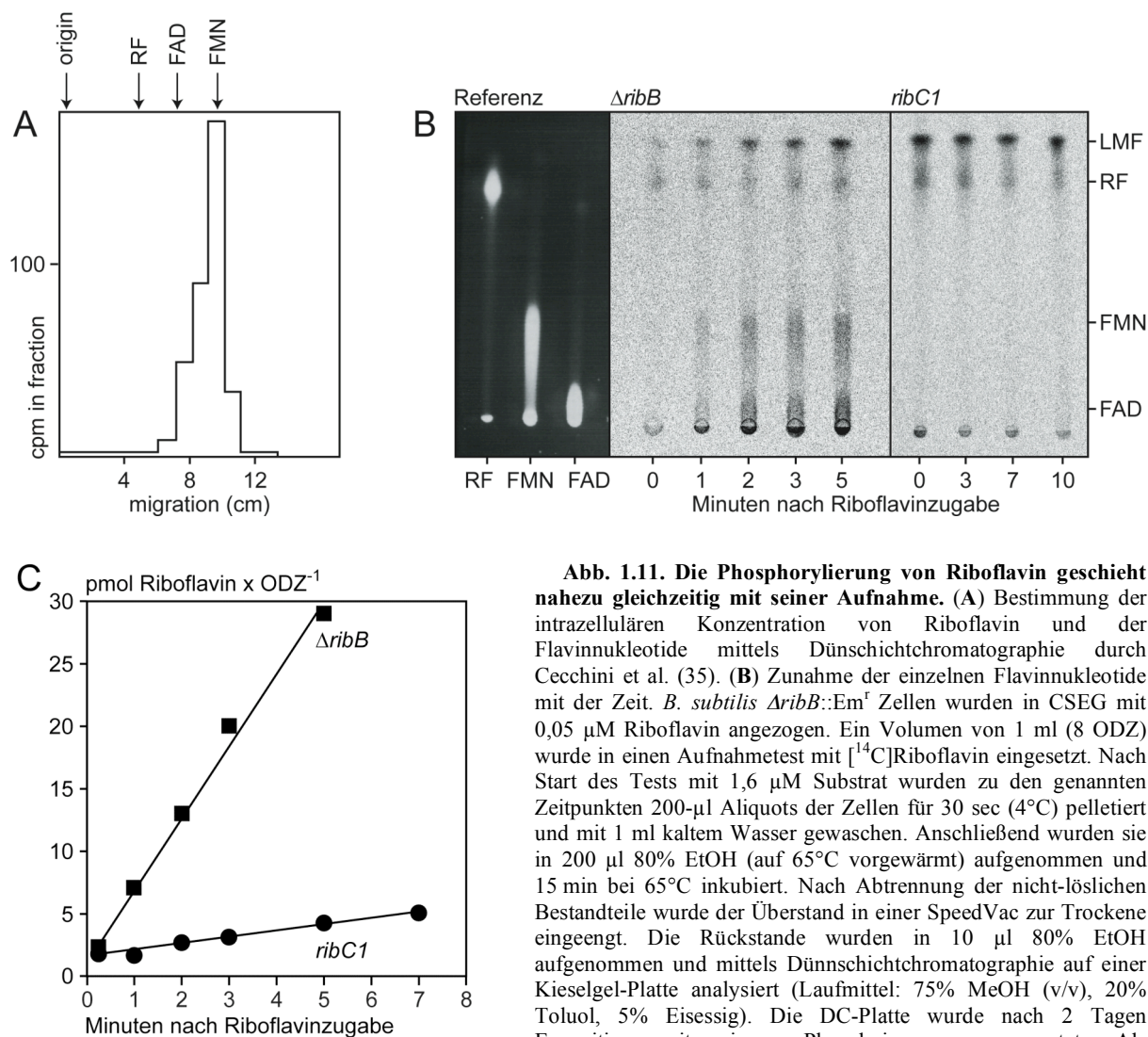
Das Phosphotransferasesystem (PTS) ist ein einzigartiges System, Zucker aus der Umgebung aufzunehmen, welches ausschließlich in der Domäne der Bakterien zu finden ist (9, 51). Das zugrunde liegende Prinzip ist die Kopplung von Transport mit gleichzeitiger Phosphorylierung des Metaboliten. Der Phosphatrest stammt dabei von Phosphoenolpyruvat und wird über die Proteine Enzym EI, HPr, EIIA und EIIB auf das Substrat übertragen. Während EI und HPr die universellen Komponenten eines jeden PTS sind, bilden EIIA und EIIB den spezifischen Teil und sind an das integrale Membranprotein assoziiert, welches von EIIC oder EIIC/D gebildet wird und den Zuckertransport übernimmt. Die EIIC Komponente kann den membranständigen Teil des PTS entweder als einzelnes Protein, als Heterodimer zusammen mit EIID bilden oder zusammen mit EIIA und EIIB auf einer Polypeptidkette liegen (219). Der Translokationskanal wird meist aus zehn TMDs geformt, die entweder von EIIC alleine oder von dem Heterodimer EIIC (5-7 TMDs) und EIID (2-5 TMDs) stammen können.

Ascorbat (Vitamin C) ist das bislang einzige wasserlösliche Vitamin, das mithilfe eines spezifischen PTS aufgenommen wird (290). Neben der schwachen Homologie von YpaA zum Fruktose-spezifischen Enzym EII aus *Lactobacillus acidophilus* sprachen weitere Gründe dafür, dass auch die Aufnahme von Riboflavin über ein PTS erfolgen könnte. Riboflavin, bestehend aus einem Isoalloxazinringsystem und einer Ribitylseitenkette, könnte als Zuckerderivat ein mögliches PTS-Substrat darstellen. Erste Untersuchungen zur Inhibition des Riboflavintransports durch Analoga ergaben, dass nur Riboflavinderivate und nicht der Isoalloxazinring *per se* gute Kompetitoren waren (35). Demnach scheint der Zuckerrest eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Substrates zu spielen.

Des Weiteren besitzt YpaA mit seinen fünf hydrophoben Domänen die Anzahl an Transmembranspannen, wie sie für EIIC/EIID Proteine typisch ist und könnte somit als Hetero- oder Homodimer die Membrankomponente eines PTS bilden. Zuletzt ist die Tatsache zu erwähnen, dass 96% des aufgenommenen Riboflavins innerhalb von 30 sec zu FMN phosphoryliert und teilweise in FAD umgewandelt wurden. Dies spräche für eine Kopplung der Phosphorylierung und damit der



Flavokinaseaktivität an den Transport (35). Außerdem ist *B. subtilis* nicht in der Lage, die bereits phosphorylierte Form von Riboflavin, FMN, aufzunehmen (35). Die Analyse von Zellextrakten der Stämme *ΔribB* und *ribC1* durch Dünnschichtchromatographie bestätigte die Ergebnisse von Cecchini et al. ((35), Abb. 1.11 A). Während die Menge an Riboflavin in *ΔribB* Zellen, die eine sehr hohe Transportaktivität für Riboflavin besaßen (Abb. 1.11 C), nahezu unverändert blieb, nahm die der phosphorylierten Formen FMN und FAD deutlich zu (Abb. 1.11 B).

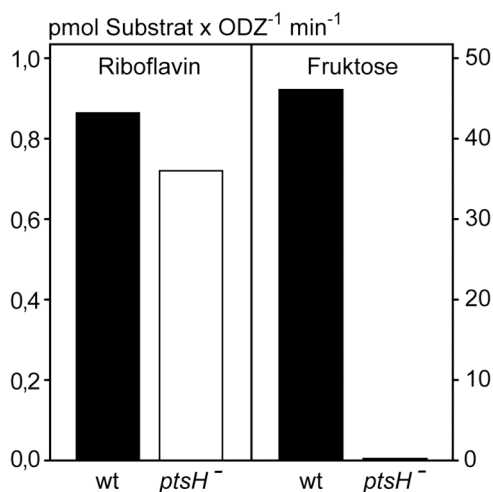


und FAD-Lösungen (jeweils 5  $\mu$ l einer 540  $\mu$ M Lösung), deren Position durch Fluoreszenz bei 366 nm sichtbar gemacht wurde. Der R<sub>F</sub>-Wert betrug 0,73 und entsprach damit dem Literaturwert (0,72). LMF: Laufmittelfront (C) Entsprechende Aufnahmeaktivitäten der für die DC-Analyse verwendeten Zellen.

Im Gegensatz dazu besaßen *ribC1* Mutanten eine Aufnahmeaktivität, die der von Wildtypzellen entsprach (Abb. 1.11 C, Abb. 1.9), obwohl *ypaA* aufgrund der fehlenden Repression des RFN-Elements in *ribC1* Zellen rund 11fach stärker exprimiert werden sollte (137). Das Ergebnis des Aufnahmetests lässt sich auch in diesem Fall durch Dünnschichtchromatographie bestätigen. Da die Flavokinase/FAD Synthetase in *ribC1* Zellen nahezu vollständig inaktiv ist, lässt sich auch keine

Akumulation der Cofaktoren FMN und FAD nachweisen (Abb. 1.11 C). Die Substanz, die an der Laufmittelfront (LMF) läuft, wurde nicht näher untersucht.

Die Frage nach der Existenz eines Riboflavin-spezifischen PTS wurde durch Aufnahmetests mit einer *ptsH* Mutante beantwortet. Das von *ptsH* kodierte Protein HPr ist das zentrale Enzym eines jeden PTS. Für seine Funktionalität ist der essentielle Histidinrest His43 entscheidend, welcher vom Enzym EI phosphoryliert wird. Dieses Histidin ist in der *ptsH* Mutante gegen Alanin substituiert, wodurch die Phosphatübertragung und damit alle Phosphotransferasesysteme zum Erliegen kommen. In Aufnahmetests mit [<sup>14</sup>C]Riboflavin war keine signifikant verminderte Transportaktivität der *ptsH* Mutante festzustellen. Zur Kontrolle wurde die Transportaktivität für [<sup>14</sup>C]Fruktose in beiden Stämmen gemessen, die, wie erwartet, in der *ptsH* Mutante nicht nachweisbar war (Abb. 1.12). Als Ergebnis kann zusammengefasst werden, dass Riboflavin nicht durch ein neuartiges PTS transportiert wird und deshalb über einen anderen Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen werden muss.



**Abb. 1.12. Die Riboflavinaufnahme erfolgt nicht über ein Phosphotransferasesystem (PTS).** *ptsH* kodiert für die essentielle Proteinkomponente HPr. In *ptsH* Mutanten führt eine H43A Mutation in HPr zum Verlust der Funktionalität, womit die Aufnahme aller PTS-Substrate zum Erliegen kommt. Diese Zellen wurden mit *B. subtilis* Wildtyp in ihrem Transportvermögen von Riboflavin und Fruktose verglichen. Für die Riboflavinaufnahme wurden die Zellen mit 1 mM Sorbitol, einem nicht-PTS Substrat, energetisiert. Die Fruktosesaufnahme erfolgte ohne Energetisierung.

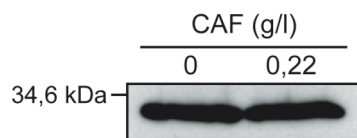
#### I.C.1.4. Untersuchungen zur Regulation der Genexpression von *ypaA*

Zur Untersuchung der Expression von *ypaA* in *B. subtilis* wurde ein 8His-Epitop an den C-Terminus von YpaA fusioniert und das entsprechende Gen mithilfe des Plasmids pMUTIN in den *ypaA* Locus integriert. Die Integration führte zu einer Verdopplung des *ypaA* Locus, wobei die erste, markierte Kopie unter der Kontrolle des RFN-Elements stand, während die Expression der zweiten Kopie, die das Wildtypallel darstellte, durch den *P<sub>spac</sub>* Promotors gesteuert werden kann (110).

##### I.C.1.4.1. Die Regulation durch Eisen

In manchen Organismen, wie den pathogenen Bakterien *Helicobacter pylori* oder *Campylobacter jejuni* sowie höheren Pflanzen, geht die Aufnahme von Eisen aus der Umgebung meist mit einer gesteigerten Riboflavinbiosynthese und Ausscheidung von Riboflavin einher. Im 5'-Bereich von *ypaA*

befände sich 540 bp vor dem des Start-GTG eine nahezu perfekte FUR-Box (-536 **TGA**t**AAT**tttaacat**ATT**c**TCA** -520), die die meisten Gene, die am Eisenmetabolismus beteiligt sind, reguliert. Im Gegensatz zur FUR-Konsensussequenz (**TGA**n**AAT**n**ATT**n**TCA**) (7), die aus einem 7-1-7 Inverted Repeat besteht, enthält diese mögliche FUR-Box sieben statt nur einer Base zwischen den Repeats. Ein eventueller Einfluss der Eisenkonzentration im Medium auf die Expression von *ypaA* wurde mit einem *B. subtilis* Wildtyp untersucht, dessen *ypaA* Lokus eine ZZ-markierte Version des Gens enthielt. Die Zellen wurden zunächst zweimal über Nacht in CSEG ohne Ammoniumeisensitrat (CAF) an Eisen verarmt, bevor sie in CSEG ohne bzw. mit 0,22 g/l CAF (was der 10fachen Konzentration im CSEG Medium entspricht) angezogen wurden. Eine Western Blot Analyse mit isolierten Membranproteinen zeigte keinen Unterschied in der Expressionsstärke von *ypaA* (Abb. 1.13).



**Abb. 1.13. Die Expression von *ypaA* wird nicht durch Eisen reguliert.** *B. subtilis* mit genomisch integriertem *ypaA*-ZZ wurde über zwei Tage in jeweils frischem CSEG ohne CAF an Eisen verarmt, bevor sie in CSEG ohne bzw. mit 0,22 g/l CAF angezogen wurden. Die Expression wurde mit isolierten Membranproteinen durch Western Blot Analyse mit anti-mouse IgG überprüft.

#### I.C.1.4.2. Die Regulation durch Riboflavin

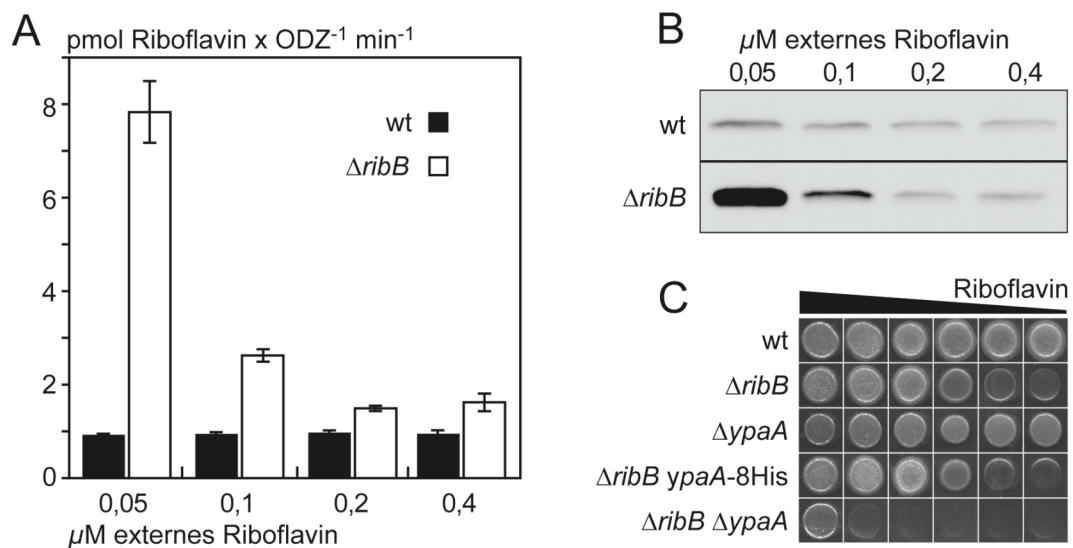
In ihren Arbeiten beschrieben Cecchini et al. (34, 35), dass die Fähigkeit von *B. subtilis* Zellen, Riboflavin zu binden und zu transportieren, sehr stark von der Riboflavinkonzentration im Medium abhängt. Dies und das RFN-Element im 5'-Promotorbereich von *ypaA* sprechen – neben dem Nachweis durch Knockout und Überexpression – dafür, dass YpaA am Riboflavintransport beteiligt ist und seine Expression durch Riboflavin bzw. den Effektor FMN reguliert wird.

Um dies zu überprüfen, wurde das Gen *ribB* deletiert, welches die Riboflavinsynthase ( $\alpha$ -Untereinheit) kodiert. Der so generierte riboflavinauxotrophe Stamm ( $\Delta ribB::Em^r$ ) zeigt beeinträchtigtes und langsames Wachstum bei einer Konzentration von 0,05  $\mu$ M Riboflavin und benötigt für optimales Wachstum mindestens 0,5  $\mu$ M (Abb. 1.14 C). *B. subtilis* Wildtyp und  $\Delta ribB$  Zellen wurden in CSEG Medium angezogen, dem unterschiedliche Mengen an Riboflavin zugesetzt wurden. Die Transportaktivität für [ $^{14}$ C]Riboflavin wurde für beide Stämme unter den jeweiligen Bedingungen bestimmt. Wildtypzellen, die aufgrund ihrer Riboflavinbiosynthese nicht auf externe Quellen angewiesen sind, zeigten wie erwartet eine konstant schwache Transportaktivität. Im Gegensatz dazu war die Aufnahmerate in  $\Delta ribB$  Zellen unter Mangelbedingungen (0,05  $\mu$ M) rund 8fach induziert. Mit steigender Riboflavinkonzentration im Medium näherte sie sich der basalen Aufnahmeaktivität der Wildtypzellen an (Abb. 1.14 A).

Die Frage, ob die Abnahme der Transportaktivität mit einer verringerten Proteinmenge von YpaA korrelierte, wurde durch Western Blot untersucht. Dazu wurde mithilfe des Plasmids pMUTIN

eine C-terminal 8His-markierte Version von *ypaA* in den *ypaA* Locus von *B. subtilis* Wildtyp und einer  $\Delta ribB::Tc^R$  Mutante integriert. Die Anzuchtbedingungen für die YpaA-8His Wildtyp und  $\Delta ribB$  waren dieselben wie für die Aufnahmetests. Nach Isolierung der Membranfraktion und SDS-PAGE ließ die Western Blot Analyse erkennen, dass der Grund für die gesteigerte Aufnahmeaktivität bei 0,05  $\mu M$  Riboflavin in der  $\Delta ribB$  Mutante eine stark erhöhte Menge an YpaA in der Membranfraktion war. Die Proteinmenge im Wildtyp hingegen war, unabhängig von der Riboflavinkonzentration, nur sehr gering, was die niedrige Transportrate widerspiegelt (Abb. 1.14 B).

Das Wachstum der verwendeten Stämme wurde auf CSEG Medium mit absteigenden Riboflavinkonzentrationen getestet und mit einem  $\Delta ribB::Em^r$   $\Delta ypaA::Km^r$  Doppelknockout verglichen. Wie erwartet konnte die  $\Delta ypaA$  Mutante, die über Riboflavinbiosynthese verfügt, ebenso wie der Wildtyp, auch ohne Riboflavinzugabe wachsen.  $\Delta ribB$  und  $\Delta ribB$  *ypaA*-8His Zellen sind auf Riboflavintransport über YpaA angewiesen und hatten denselben Riboflavinbedarf: Beide benötigten mindestens 0,05  $\mu M$  für optimales Wachstum. Dies zeigte außerdem, dass die Aktivität von YpaA durch das C-terminale 8His-Epitop nicht beeinflusst wurde. Sind, wie in der  $\Delta ribB$   $\Delta ypaA$  Doppelmutante, sowohl Biosynthese als auch Transport defekt, musste das Medium mit mindestens 50  $\mu M$  Riboflavin versetzt werden, das bei dieser hohen Konzentration wahrscheinlich passiv in die Zellen gelangte und den Wachstumsdefekt behob (Abb. 1.14 C).



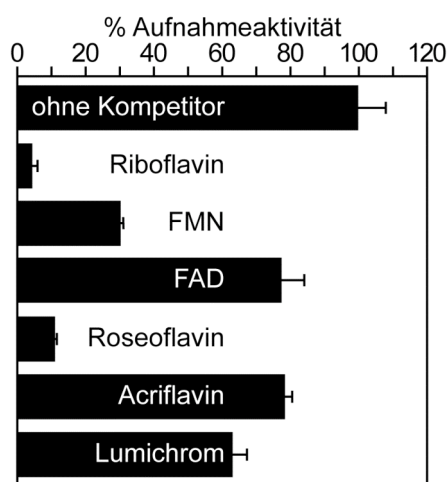
**Abb. 1.14. Die Riboflavinkonzentration im Medium reguliert sowohl die Transportaktivität von *B. subtilis*  $\Delta ribB$  als auch die Expression von *ypaA*.** (A) *B. subtilis* Wildtyp (■) oder  $\Delta ribB::Em^r$  (□) wurden in CSEG mit angegebenem Riboflavinegehalt angezogen und in Aufnahmetests mit [<sup>14</sup>C]Riboflavin eingesetzt. Die Aufnahmezeit wurde für die ersten vier Minuten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (B) Wildtyp oder  $\Delta ribB::Tc^r$  mit genomisch integriertem, C-terminal 8His-markiertem *ypaA* wurden in CSEG, versetzt mit angegebenen Riboflavinkonzentrationen, angezogen. Nach Isolierung der Membranproteine erfolgte eine Western Blot Analyse mit Penta-His mouse monoklonalem Antikörper. (C) Wachstum von *B. subtilis* Wildtyp,  $\Delta ribB::Em^r$ ,  $\Delta ypaA::Km^r$ ,  $\Delta ribB::Tc^r$  *ypaA*-8His und der Doppelmutante  $\Delta ribB::Em^r$   $\Delta ypaA::Km^r$  auf CSEG Platten, versetzt mit 54  $\mu M$ , 5,4  $\mu M$ , 540 nM, 54 nM, 5,4 nM oder 0,54 nM Riboflavin (von links nach rechts) nach 24 Std. bei 37°C.

### I.C.1.5. Die Charakterisierung des YpaA-vermittelten Riboflavintransports

Zunächst wurde das pH-Optimum der Riboflavinaufnahme in *B. subtilis* untersucht. Es zeigten sich jedoch im Bereich zwischen pH 5 und pH 8 keine Unterschiede in der Aufnahmerate (Daten nicht gezeigt). Alle nachfolgenden Aufnahmetests mit [ $^{14}$ C]Riboflavin wurden bei pH 7 und mit der *AribB::Em<sup>r</sup>* Mutante durchgeführt, die bei Anzucht in CSEG mit 0,05  $\mu$ M Riboflavin maximale Transportaktivität besaß.

#### I.C.1.5.1. Der Einfluss von Riboflavinanaloga

Die Substratspezifität von YpaA wurde durch Aufnahmetests mit [ $^{14}$ C]Riboflavin in Gegenwart eines 10fach molaren Überschusses an verschiedenen, nicht-markierten Strukturanaloga ermittelt. Innerhalb der Gruppe der Flavine inhibierte Riboflavin den Transport wie erwartet fast vollständig, während seine phosphorylierte Form FMN ein schwächerer Kompetitor war und FAD nur einen geringfügigen Effekt ausübte (Abb. 1.15).



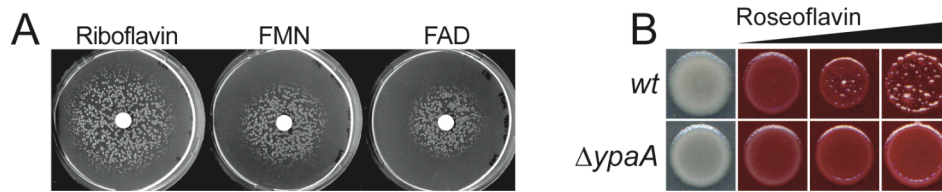
**Abb. 1.15. Charakterisierung der Substratspezifität von YpaA.** Standardaufnahmetests wurden mit *B. subtilis* *AribB::Em<sup>r</sup>*, angezogen in CSEG mit 0,05  $\mu$ M Riboflavin, durchgeführt. Die Aufnahme von [ $^{14}$ C]Riboflavin (Anfangskonzentration 1,6  $\mu$ M) wurde in Ab- oder Anwesenheit eines 10fach molaren Überschusses (16  $\mu$ M) von strukturverwandten Verbindungen bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte mit Fehlerbalken von drei unabhängigen Experimenten.

Dieselbe Abstufung war in einem Wachstumstest mit *AribB* Zellen auf Riboflavin-freien Platten zu beobachten. Die größte Wachstumszone entstand um ein Filterplättchen, auf dem Riboflavin aufgebracht war. FMN und FAD unterstützten ebenfalls das Wachstum, jedoch deutlich schlechter (Abb. 1.16 A). Das toxische Riboflavinanalogon Roseoflavin (8-Dimethyl-amino-8-demethyl-D-Riboflavin) inhibierte die Aufnahme um rund 90% und damit nahezu genauso gut wie Riboflavin. Isoalloxazinderivate ohne Ribitylseitenkette, wie Acriflavin und Lumichrom, waren ebenfalls nur schwache Kompetitoren und verringerten den Transport von Riboflavin um rund 20%.

Roseoflavin blockiert nicht nur die Riboflavinaufnahme, sondern wird auch von YpaA als Substrat erkannt und in die Zellen transportiert. Während eine Konzentration von 200-500  $\mu$ M toxisch



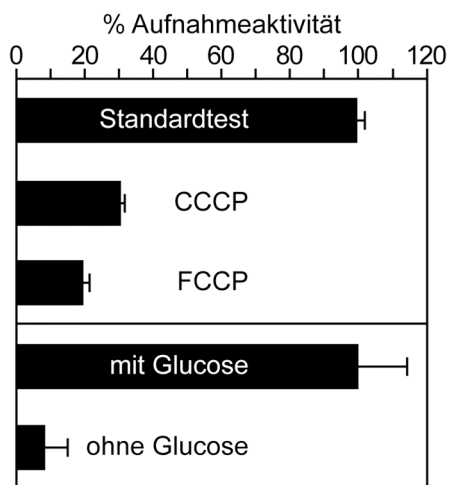
für Wildtypzellen war, führte die Deletion von *ypaA* zur Resistenz gegenüber dem Analogon (Abb. 1.16 B)



**Abb. 1.16. Aufnahme von Riboflavinanaloga in *B. subtilis*.** (A) *ΔribB::Em<sup>r</sup>* Zellen wurden auf CSEG Platten ausgebracht, in deren Mitte Filterplättchen mit 20 μl einer Riboflavin-, FMN- oder FAD-Lösung (540 μM) aufgelegt wurden. Der Durchmesser der Wachstumszone wurde nach 24 Std. bei 37°C ausgemessen und betrug 76 mm (Riboflavin), 50 mm (FMN) bzw. 42 mm (FAD). (B) Wachstum von Wildtyp (wt) und *ΔypaA::Km<sup>r</sup>* auf CSEG Platten (von links nach rechts) ohne bzw. mit 100, 200 und 500 μM Roseoflavin.

### I.C.1.5.2. Die Energieabhängigkeit des Riboflavintransports

Frühere Untersuchungen von Cecchini et al. (35) zeigten, dass es sich beim Riboflavintransport in *B. subtilis* um einen aktiven und energieabhängigen Prozess handelt, der durch Stoffwechselgifte, wie Cyanid, Arsenat und Iodoacetat, sowie Entkoppler inhibierbar ist. Im Gegensatz dazu scheint der Riboflavintransporter RibU aus *L. lactis* sein Substrat mit dem Mechanismus der erleichterten Diffusion zu transportieren, der nicht vom Membranpotential oder dem Energetisierungszustand der Zellen abhängt (30). Da die Aminosäuresequenz von YpaA zu 27,9% mit der von RibU identisch ist, wurden Mechanismus und Energieabhängigkeit des Riboflavintransports in *B. subtilis* noch einmal unabhängig untersucht. Dazu wurden *ΔribB* Zellen in CSEG Medium mit 0,05 μM Riboflavin angezogen. Die Aufnahmeaktivität von YpaA war in Gegenwart der Entkoppler CCCP und FCCP um mehr als 70% herabgesetzt (Abb. 1.17).



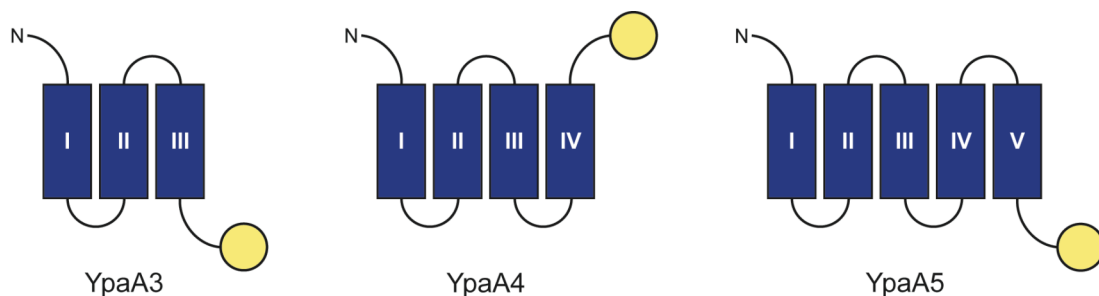
**Abb. 1.17. Charakterisierung der Energieabhängigkeit des Riboflavintransports.** *B. subtilis ΔribB::Em<sup>r</sup>* wurde in CSEG mit 0,05 μM Riboflavin angezogen und in Standardaufnahmetests eingesetzt. Die Zellen wurden nach Energetisierung für drei Minuten mit den Entkopplern CCCP und FCCP (je 100 μM) inkubiert, bevor der Test durch Zugabe von 1,6 μM [<sup>14</sup>C]Riboflavin gestartet wurde. Der Einfluss von Glukose auf die Aufnahme wurde mit Zellen untersucht, die in Transportpuffer aufgenommen und für 2 Std. auf Eis inkubiert wurden. Die Transportaktivität wurde anschließend mit und ohne Energetisierung der Zellen durch 1 mM Glukose bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte mit Fehlerbalken von drei unabhängigen Experimenten.

Der Einfluss von Glukose als Energiequelle auf den Riboflavintransport wurde mit Zellen untersucht, die in Transportpuffer aufgenommen und zur De-Energetisierung zwei Stunden auf Eis inkubiert wurden. Wurde der anschließende Aufnahmetest in Abwesenheit von Glukose durchgeführt, war die Transportaktivität stark reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die Riboflavinaufnahme durch Zugabe von Glukose stimuliert und die Aufnahmeaktivität war ähnlich hoch wie bei Zellen, die zuvor nicht verarmt worden waren (Abb. 1.17).

Fasst man die Ergebnisse der Aufnahmetests zusammen, so besitzt *B. subtilis* einen aktiven, an das Membranpotential gekoppelten Transportprozess, der spezifisch Riboflavin und nicht die Cofaktor-Formen FMN und FAD durch Protonensymport in den Zellen akkumuliert. Trotz des strukturellen Unterschieds im Isoalloxazinring wird Roseoflavin von YpaA ebenso gut als Substrat erkannt wie Riboflavin.

### I.C.1.6. Die Membrantopologie von YpaA

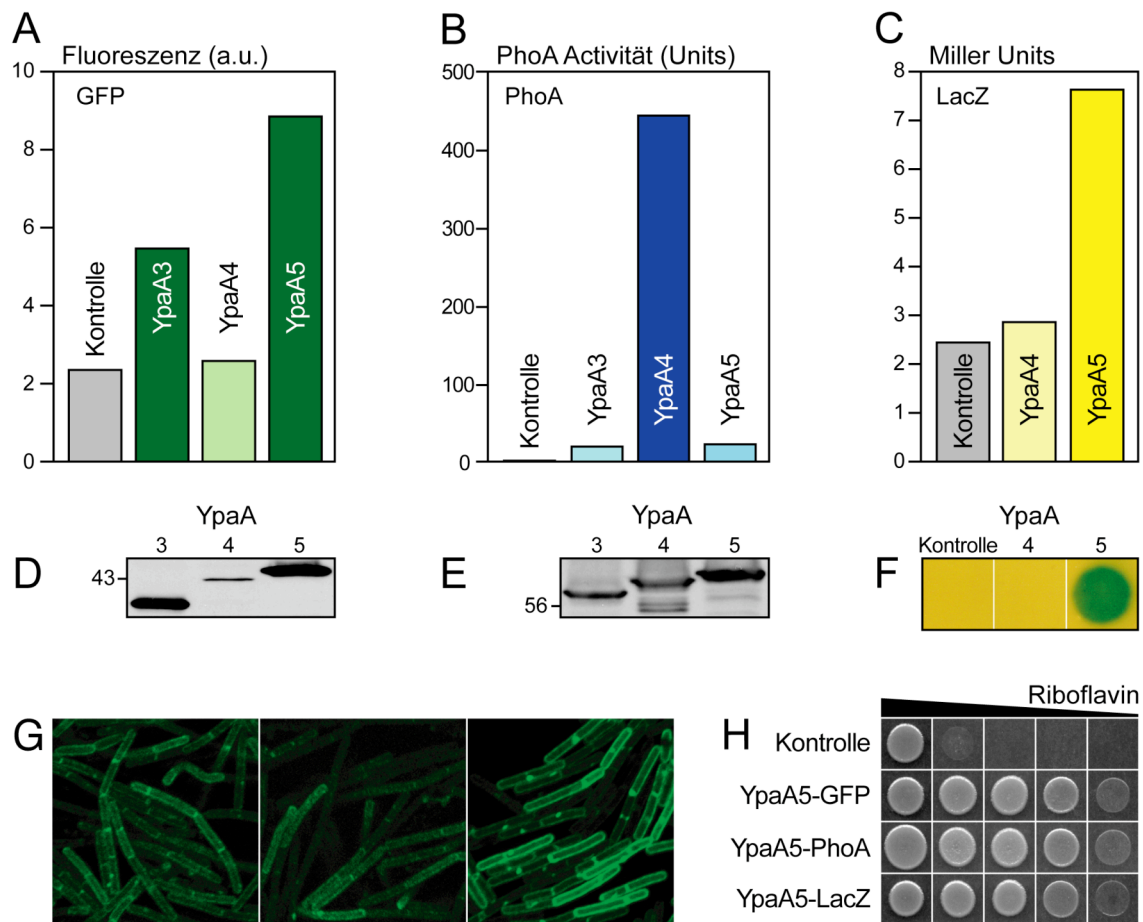
Bioinformatische Analyseprogramme wie TMPred (83) erkennen fünf hydrophobe Bereiche und damit mögliche Transmembrandomänen in der Aminosäuresequenz von YpaA. Aufgrund dieser ungeraden Anzahl müssen N- und C-Terminus auf unterschiedlichen Seiten der Plasmamembran liegen. Einen ersten Hinweis auf die Topologie lieferte die Homologie der TMDs von YpaA mit den TMDs 2-6 der Sensor Histidinkinase Familie (siehe I.C.1). Da sich ihre C-terminale Histidinkinase Domäne im Cytosol befinden muss, um katalytisch aktiv zu sein, kann gefolgert werden, dass der C-Terminus von YpaA ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert sein sollte.



**Abb. 1.18. Schematische Darstellung der YpaA-Verkürzungen YpaA3, YpaA4 und YpaA5 und ihre C-terminale Fusion an die Reporterproteine GFP, LacZ oder PhoA (als gelber Kreis dargestellt).**

Die Topologie von YpaA wurde experimentell durch Fusion mit den Reporterproteinen Green Fluorescence Protein (GFP),  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) und Alkalische Phosphatase (PhoA) untersucht. Dabei sind GFP und LacZ nur im Cytoplasma fluoreszent bzw. aktiv, während PhoA seine korrekte Faltung und Aktivität nur erlangt, wenn es extrazellulär lokalisiert ist (54, 154, 155). Die Reporter wurden C-terminal an das Volllängenprotein YpaA5 (TMDs 1-5) und die verkürzten Versionen YpaA4 (TMDs 1-4, aa 1-146) sowie YpaA3 (TMDs 1-3, aa 1-103) fusioniert und mithilfe des

Plasmids pDG148-Stu in *B. subtilis* Wildtypzellen überexprimiert (Abb. 1.18). Die Verkürzungen YpaA2 und YpaA1 lieferten, vermutlich wegen fehlerhafter Insertion in die Membran, keine aussagekräftigen Ergebnisse und wurden nicht in die Bestimmung der Topologie einbezogen. Die Fluoreszenz der GFP-Fusionen wurde sowohl fluorometrisch bestimmt als auch durch konfokale Mikroskopie visualisiert. Zellen, die die Fusionen *ypaA3-gfp* und *ypaA5-gfp* exprimierten, zeigten in beiden Fällen stark erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu *ypaA4-gfp*, was für eine cytoplasmatische Lokalisation des C-Terminus sprach (Abb. 1.19 A, G). Diese Annahme wurde durch die Aktivitäten von YpaA5-LacZ und YpaA4-LacZ im Flüssig- und Overlay-Test gestützt (Abb. 1.19 C).



**Abb. 1.19. Die Membrantopologie von YpaA.** Der Hydropathieanalyse durch TMPred entsprechend wurden YpaA5 (TMDs 1-5) und die Verkürzungen YpaA4 (TMDs 1-4, aa 1-146) und YpaA3 (TMDs 1-3, aa 1-103) C-terminal mit den Reportern GFP, PhoA und LacZ fusioniert. Die Fusionen wurden mithilfe des Plasmids pDG148-Stu in *B. subtilis* Wildtypzellen überexprimiert, die in LB Medium angezogen und mit IPTG induziert wurden. (A-C) Die Fluoreszenz bzw. Aktivitäten der Fusionsproteine wurden durch Fluoreszenzspektroskopie oder Flüssigtests ermittelt (154, 170). (D, E) Western Blot Analyse mit Membranfraktionen von *ypaAX-gfp* und *ypaAX-phoA* exprimierenden Zellen mit anti-GFP (D) und anti-PhoA (E) Serum. Die berechneten Molekulargewichte der GFP-Fusionen betragen 38,2 kDa (YpaA3), 42,7 kDa (YpaA4) und 47,6 kDa (YpaA5) und die der PhoA-Fusionen 59,1 kDa (YpaA3), 63,7 kDa (YpaA4) und 68,7 kDa (YpaA5). (F) LacZ-Overlaytest mit *B. subtilis* Wildtypzellen, die mit den Plasmiden pDG148-Stu (Kontrolle), pDG148-*ypaA4-lacZ* (YpaA4) oder pDG148-*ypaA5-lacZ* (YpaA5) transformiert waren. Die Zellen wurden auf SP Platten mit 0,5 mM IPTG aufgetropft und über Nacht bei 37°C inkubiert, bevor sie mit der Overlay-Lösung überschichtet wurden. Die Farbreaktion wurde nach drei Stunden bei 37°C dokumentiert. (G) Die Fluoreszenzintensität von YpaA3-GFP (links), YpaA4-GFP (Mitte) und YpaA5-GFP (rechts) visualisiert durch konfokale Mikroskopie. (H) Überprüfung der Funktionalität der Vollängen-Fusionsproteine in *B. subtilis* *AribB::Em<sup>r</sup> ΔypaA::Km<sup>r</sup>* auf CSEB Platten mit 0,5 mM IPTG und 54 µM, 5,4 µM, 540 nM, 54 nM, 5,4 nM und 0,54 nM Riboflavin. Das Wachstum wurde nach 24 Std. bei 37°C dokumentiert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit einem leeren Vektor transformiert waren.

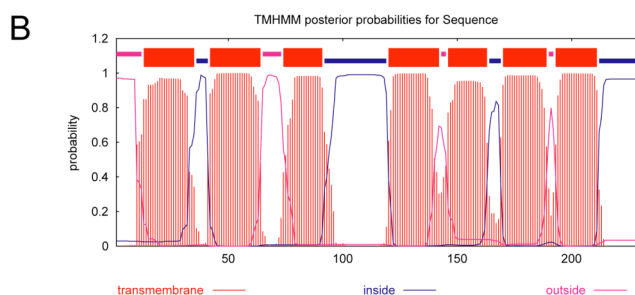
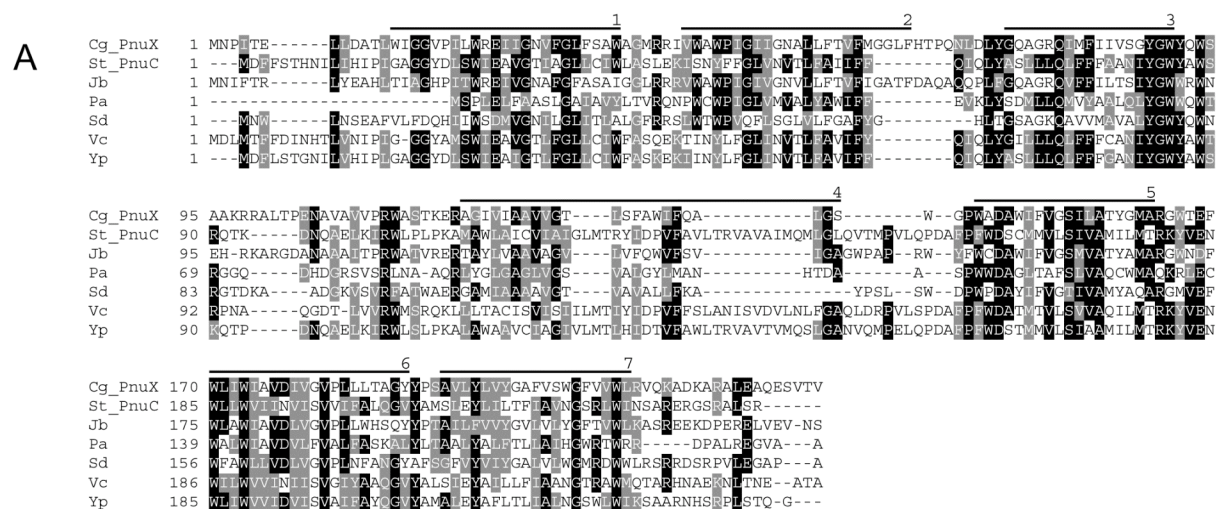


Das komplementäre Bild lieferten die PhoA-Fusionsproteine, von denen YpaA4-PhoA die höchste Aktivität besaß (Abb. 1.19 B). Die Expression der GFP- und PhoA-Fusionen wurde außerdem durch Western Blot Analyse überprüft (Abb. 1.19 D, E). Hier fällt die geringe Menge an YpaA4-GFP auf, die mit der schwächeren Fluoreszenz korreliert. Der Grund dafür ist nicht eine grundsätzlich schwächere Expression, sondern die vermutlich geringere Stabilität aufgrund der extrazellulären Lokalisation und der dadurch bedingten Missfaltung (54). Die Funktionalität der Fusionsproteine wurde durch Expression in der  $\Delta ribB::Em^r \Delta ypaA::Km^r$  Doppelmutante überprüft. Alle Fusionen mit YpaA5 waren funktionell und konnten den Phänotyp komplementieren (Abb. 1.19 H). Fusionen der verkürzten Versionen YpaA4 und YpaA3 waren nicht funktionell (Daten nicht gezeigt).

## I.C.2. Die Charakterisierung des Riboflavintransporters RibM aus *Corynebacterium glutamicum*

### I.C.2.1. *In silico* Analyse von RibM

Das Protein RibM aus dem Gram-positiven Bakterium *C. glutamicum* besteht aus 230 Aminosäuren und besitzt, der Analyse durch TMHMM zufolge, sieben putative Transmembranspannen. Die Verbindungen der einzelnen Transmembrandomänen (TMD) sind relativ kurz, mit Ausnahme eines längeren, vermutlich intrazellulären Loops zwischen TMD3 und TMD4, der zwar in allen homologen Proteinen zu finden, aber nicht stark konserviert ist. Die Primärstruktur enthält nahezu in ihrer ganzen Länge eine konservierte Domäne der PnuC Familie, deren Mitglieder bakterielle Transporter für Nicotinamidribosid repräsentieren (Abb. 1.20, (222)).

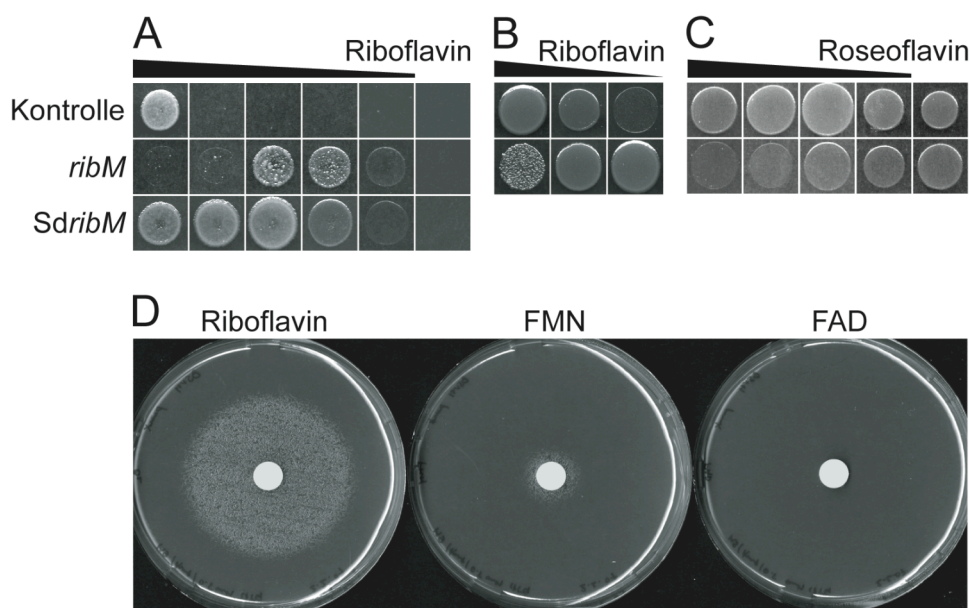


**Abb. 1.20. Sequenzanalyse von RibM.**  
 (A) Vergleich der Aminosäuresequenz von RibM (*C. glutamicum*, Cg\_RibM), PnuC (*Salmonella typhimurium*, St\_PnuC, 20,1% Identität), und den RibM-Homologen aus *Janibacter* (Jb, gi:84496637, 53%), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa, gi:84321416, 25%), *Streptomyces davawensis* (Sd, gi: 82791820, 40%), *Vibrio cholerae* (Vc, gi: 153830426, 24%) und *Yersinia pestis* (Yp, gi: 16121428, 27%).  
 (B) Hydropathieanalyse von RibM mit TMHMM.

### I.C.2.2. RibM transportiert Riboflavin und vermittelt Sensitivität gegenüber Roseoflavin

Die Fähigkeit von RibM aus *C. glutamicum* (NCgl0063), Riboflavin zu transportieren, wurde durch Expression in *B. subtilis*  $\Delta ribB$   $\Delta ypaA$  nachgewiesen. Wie auch sein Orthologes RibM (in dieser

Arbeit als SdRibM bezeichnet) aus *Streptomyces davawensis* (ABB90841, (71)) komplementierte RibM den Wachstumsdefekt des Doppelknockouts sehr gut und erlaubte Wachstum bis zu einer Konzentration von 0,05  $\mu$ M Riboflavin, während der Ausgangsstamm 50  $\mu$ M Riboflavin benötigte (Abb. 1.21 A). Da *E. coli* kein Transportsystem für Riboflavin besitzt, ist das Bakterium auf seine Biosynthese angewiesen (Abb. 1.22 C, (4)). Riboflavinauxotrophe *E. coli* Mutanten, wie BSV11, benötigen mindestens 5  $\mu$ M Riboflavin im Medium für optimales Wachstum und haben damit einen sehr viel niedrigeren Bedarf an Riboflavin wie *B. subtilis*. RibM wurde auch in BSV11 Zellen funktionell exprimiert und vermittelte eine optimale Versorgung der Zellen mit Riboflavin (Abb. 1.21 B).



**Abb. 1.21. Die heterologe Expression von *ribM* oder *SdribM* in riboflavinauxotrophen *B. subtilis* und *E. coli* Stämmen erlaubt Wachstum auf niedrigen Riboflavinkonzentrationen.** (A) Das Wachstum von *B. subtilis*  $\Delta ribB::Em^r$   $\Delta ypaA::Km^r$ , transformiert mit leerem pDG148-Stu (Kontrolle), pDG148-Stu-*ribM*-6His (*ribM*) oder pIX12-*SdribM* (*SdribM*), wurde auf CSEG Platten mit (von links nach rechts) 54  $\mu$ M, 5,4  $\mu$ M, 540 nM, 54 nM, 5,4 nM oder ohne Riboflavin getestet. (B) Wachstumstest mit *E. coli* BSV11 Zellen, die entweder ein leeres pDG148 Plasmid (Kontrolle) oder pDG148-*ribM*-6His (*ribM*) enthielten, auf M9 Platten mit 54  $\mu$ M, 5,4  $\mu$ M oder 540 nM Riboflavin. (C) Wachstum von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit leerem pDG148 (Kontrolle) oder pDG148-*ribM*-6His (*ribM*) auf M9 Platten mit (von links nach rechts) 10, 5, 1, 0,5 oder 0  $\mu$ M Roseoflavin. (D) *E. coli* BSV11, transformiert mit pET21a(+)-*ribM*-3HA, wurden auf M9 Platten ausgebracht, auf die Filterplättchen mit 20  $\mu$ l einer Riboflavin-, FMN- oder FAD-Lösung (540  $\mu$ M) aufgelegt wurden. Die Durchmesser der Wachstumszonen betrugen 53 mm (Riboflavin) und 18 mm (FMN). Im Fall von FAD war selbst nach einem weiteren Tag Inkubation kein Wachstum zu beobachten. Alle in dieser Abbildung verwendeten Platten enthielten 0,5 mM IPTG und wurden 24 Std. bei 37°C inkubiert.

Bei beiden Organismen – *B. subtilis* und *E. coli* – fiel jedoch ein schlechteres Wachstum bei hohen Riboflavinkonzentrationen auf, dessen Ursache nicht geklärt werden konnte. Aufgrund der Überexpression von *ribM* und des Riboflavinmangels in der biosynthesedefizienten Mutanten, wird Riboflavin wahrscheinlich in hohem Maße in die Zellen aufgenommen. Da die Inkubation der Platten nicht vollständig im Dunkeln stattfand, könnten durch Photolyse von Riboflavin vermehrt cytotoxische Abbauprodukte, entstanden sein (58). Der Wachstumsphänotyp von BSV11 konnte nur durch Riboflavin und nicht durch FMN oder FAD komplementiert werden (Abb. 1.21 D). Wegen

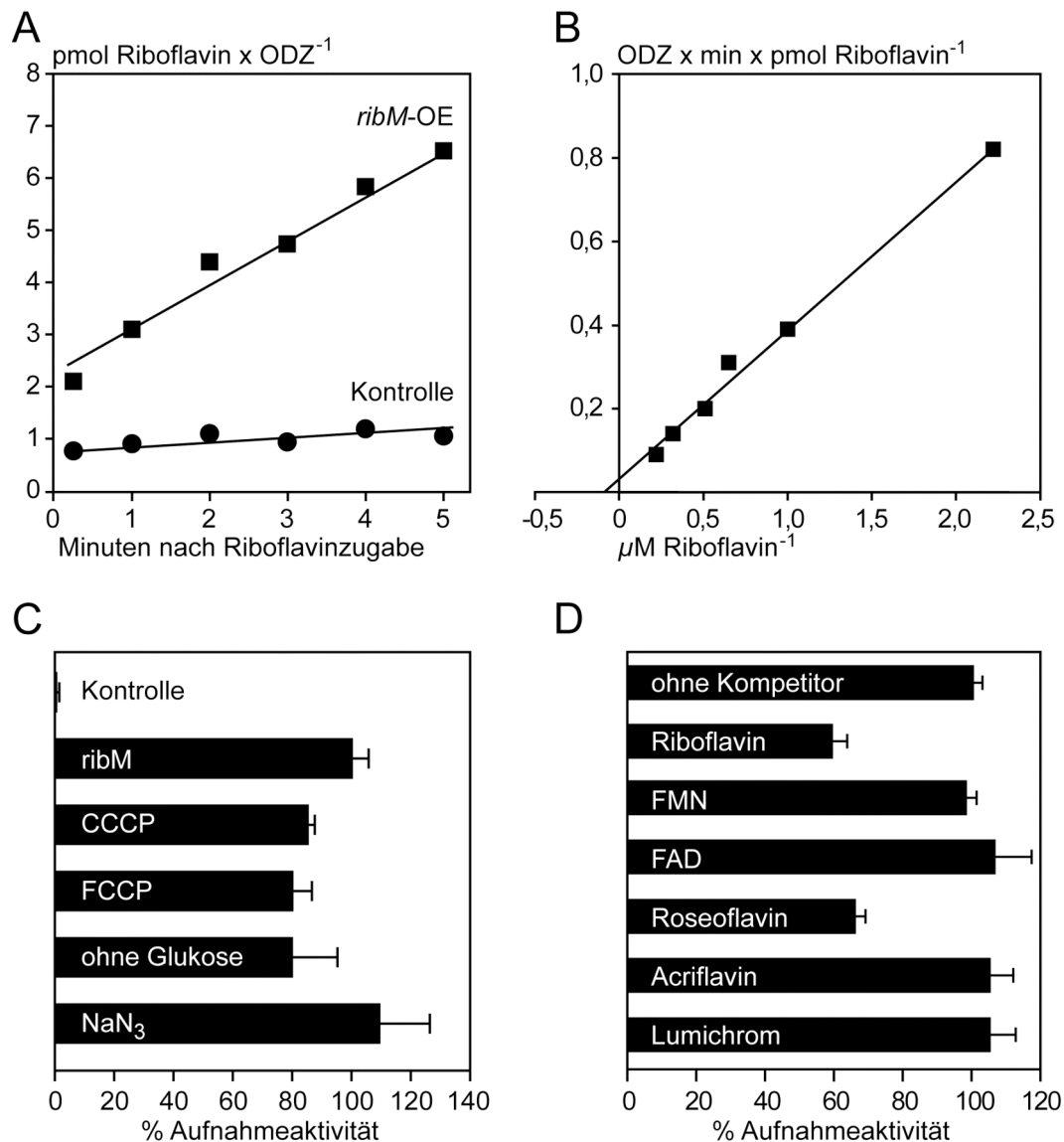
eines fehlenden Riboflavintransporters besitzt *E. coli* eine natürliche Resistenz gegenüber dem toxischen Riboflavinanalogon Roseoflavin, die aber durch die Expression von *ribM* verloren ging (Abb. 1.21 C).

### **I.C.2.3. RibM ist ein Facilitator und spezifisch für Riboflavin**

Alle nachfolgenden Tests zur Bestimmung der Kinetik und der Transporteigenschaften wurden mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt, der eine 3HA-markierte Version von *ribM* exprimiert. Im Vergleich zu einer Kontrolle mit leerem Vektor, die keinerlei Aufnahmeaktivität besaß, erlaubte die Überexpression von *ribM* den Zellen, Riboflavin aus der Umgebung aufzunehmen (Abb. 1.22 A). Der Transport war sättigbar und zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem  $K_m$ -Wert von  $11 \pm 6 \mu\text{M}$  (Abb. 1.22 B).

Um eine Aussage über den Transportmechanismus treffen zu können, wurden die Tests mit de-energetisierten Zellen durchgeführt. Weder die Abwesenheit von Glukose noch die Zugabe von Natriumazid (1 mM) führten zu einer Erniedrigung der Aufnahmeaktivität, die somit unabhängig vom Stoffwechsel und der Energetisierung der Zellen zu sein schien. Ebenso hatten die Protonophoren CCCP oder FCCP (je  $130 \mu\text{M}$ ) keinen Effekt auf die Riboflavinaufnahme, d.h. der Transportprozess war nicht vom Membranpotential oder dem pH-Gradienten der Plasmamembran abhängig (Abb. 1.22 C). Die Substratspezifität von RibM wurde in Aufnahmetests mit Flavinen und Flavinanaloga als Kompetitoren untersucht, die in einem 10fach molaren Überschuss zugegeben wurden. Neben Riboflavin war nur Roseoflavin in der Lage, die Transportaktivität herabzusetzen. Allerdings ging diese nur um 40% zurück und nicht, wie theoretisch erwartet, um 90%. Die Erklärung dafür ist, dass die Konzentration des markierten Substrats [ $^{14}\text{C}$ ]Riboflavin während des Tests  $2,2 \mu\text{M}$  betrug und damit unterhalb des  $K_m$ -Wertes lag. Das zugegebene (nicht-markierte) Substrat wirkte daher nicht nur als Kompetitor, sondern es erhöhte die Gesamt-Substratkonzentration auf rund  $25 \mu\text{M}$  und damit  $2 \times K_m$ , wodurch die Aufnahmegeschwindigkeit generell gesteigert wurde. Die Flavine FMN und FAD sowie die Isoalloxazine Acriflavin und Lumichrom hatten keinen Einfluss auf die Riboflavinaufnahme und bestätigten damit den Wachstumstest mit BSV11 (Abb. 1.22 D).

Die Ergebnisse charakterisieren RibM aus *C. glutamicum* als hoch-affinen und spezifischen Riboflavintransporter. Er katalysiert einen Prozess, der unabhängig von der energetischen Aktivierung der Zellen ist und neben Riboflavin auch Roseoflavin durch erleichterte Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten transportiert.



**Abb. 1.22. Charakterisierung der Aktivität, Energieabhängigkeit und Spezifität von RibM als Riboflavintransporter.** Alle Aufnahmetests wurden mit *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt, die mit pET21a(+)-*ribM*-3HA transformiert waren. Die Zellen wurden dazu in M9 Minimal Medium angezogen, bei einer OD<sub>600</sub> = 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert und weitere 3 Std. geschüttelt. Die Anfangskonzentration von [<sup>14</sup>C]Riboflavin im Aufnahmetest betrug 2,2  $\mu\text{M}$ . **(A)** Aufnahme von [<sup>14</sup>C]Riboflavin in Zellen, die *ribM* überexprimierten (*ribM*-OE) oder ein leeres pET21a(+) Plasmid (Kontrolle) enthielten. **(B)** Lineweaver-Burk Darstellung eines Aufnahmetests mit verschiedener Substratkonzentration. Daraus ließ sich ein  $K_m$ -Wert von 11  $\mu\text{M}$  berechnen. Zwei unabhängige Wiederholungen des Experiments ergaben  $K_m$ -Werte von 5 bzw. 17  $\mu\text{M}$ . **(C)** Standardaufnahmetest ohne weitere Zugabe (*ribM*) oder in Gegenwart von CCCP, FCCP (je 130  $\mu\text{M}$ ) oder NaN<sub>3</sub> (1 mM). Der Einfluss von Glukose wurde mit Zellen ermittelt, die für 2 Std. in Transportpuffer auf Eis inkubiert und im anschließenden Aufnahmetest nicht energetisiert wurden. **(D)** Die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]Riboflavin wurde in Anwesenheit eines 10fach molaren Überschusses (22  $\mu\text{M}$ ) an Strukturanaloga bestimmt. Die Aufnahmeaktivität ohne Kompetitor betrug 5,76 pmol OD<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (100%). In **(C)** und **(D)** sind die Messwerte von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen (Fehlerbalken) dargestellt.

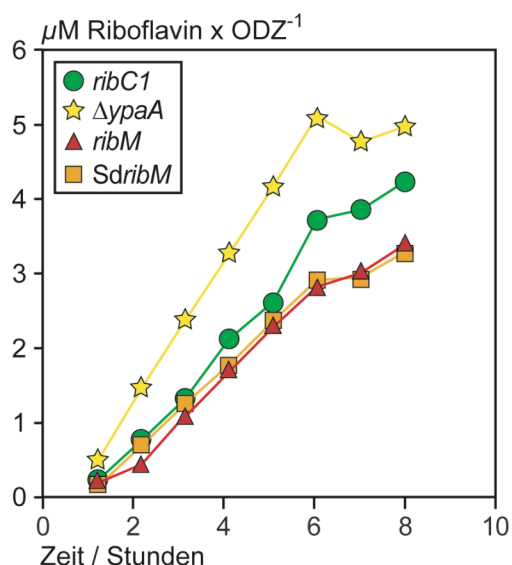
### I.C.3. Anwendungen für bakterielle Riboflavintransporter

#### I.C.3.1. Untersuchungen zur Ausscheidung von Riboflavin in *B. subtilis*

In *B. subtilis* *ribC1* ist die Bildung von FMN und FAD blockiert, was zu einer konstitutiv starken Expression der Biosynthesegene führt. Die Mutante wird daher auch als Riboflavin-Überproduzent bezeichnet. Sie synthetisiert das Vitamin in so hohem Maß, dass es ins Medium sezerniert wird, wo es schließlich auskristallisiert.

Ob *B. subtilis* über ein System für den Export von Riboflavin verfügt, ist nicht bekannt und konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Falls nicht, würde das hydrophile Vitamin durch passive Diffusion über die Zellmembran nach außen abgegeben werden. Dieser Prozess könnte mithilfe der Riboflavintransporter RibM oder SdRibM beschleunigt werden. Sie transportieren ihr Substrat abhängig von seinem Gradienten durch erleichterte Diffusion, bei Riboflavin-Überproduktion also von innen nach außen.

Die Ausscheidung von Riboflavin über die Zeit wurde in *B. subtilis* *ribC1* Stämmen untersucht, in denen *ypaA* deletiert war oder die *ribM* bzw. *SdribM* überexprimieren. Keiner der beiden Facilitatoren verhalf zu einer schnelleren Riboflavinabgabe. Die Deletion von *ypaA* hingegen führte nach sechs Stunden zu einer Konzentration von rund 5  $\mu\text{M}$  Riboflavin im Medium, die um etwa 1,5fach höher war als bei den anderen Stämmen (Abb. 1.23). Das Experiment wurde nur in einer Einfachbestimmung durchgeführt und bedarf der Wiederholung. Um die beeindruckende Produktionsleistung der  $\Delta ypaA$  Mutante zu verdeutlichen: es wurden  $2,1 \text{ mg h}^{-1} \text{ l}^{-1}$  oder, auf die Zellzahl normiert,  $0,6 \text{ mg h}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ ODZ}^{-1}$  Riboflavin synthetisiert.



**Abb. 1.23. Die Ausscheidung von Riboflavin in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen.** Untransformierte bzw. mit pIX12-*SdribM* (■), pDG148-*Stu-ribM*-6His (▲) transformierte *B. subtilis* *ribC1* Zellen (●) sowie der Knockout *ribC1*  $\Delta ypaA::Km^r$  (★) wurden in MNGE Medium mit 0,5 mM IPTG angezogen. Die Riboflavinkonzentration des Überstandes von stündlich entnommenen Aliquots wurde fluorimetrisch bestimmt und auf die  $\text{OD}_{600}$  normalisiert. Die Messwerte repräsentieren die Ergebnisse einer Einfachbestimmung.

### **I.C.3.2.      Versuche zur Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung von Flavoproteinen mit modifizierten Flavinen**

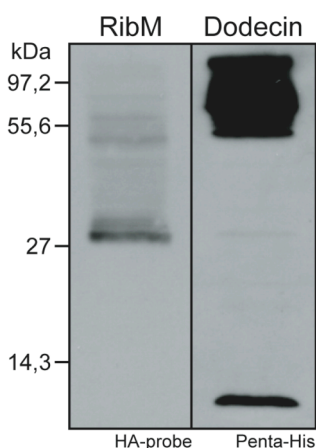
Flavine durchlaufen als Chromophore in Photorezeptoren bei ihrer Anregung einen sehr komplexen Photozyklus. Chemisch synthetisierte Riboflavinderivate, die andere strukturelle oder chemische Eigenschaften besitzen, sind für die genauere Erforschung des aktiven Zentrums und des Reaktionsmechanismus des Rezeptors unerlässlich. Für die Ablösung nicht-kovalent gebundener Flavine wurden mittlerweile zahlreiche Protokolle entwickelt, die auf De- und anschließender Renaturierung in Anwesenheit der neuen Chromophors basieren (79). Dabei ist der Austausch der Flavine allerdings meist nicht vollständig und es muss ein hoher Verlust an funktionellem Protein in Kauf genommen werden. Kovalent gebundene Cofaktoren auszutauschen gelingt bislang nur, indem die an der Bindung beteiligten Aminosäuren mutiert werden. Allerdings hat dies sehr wahrscheinlich Auswirkungen auf die Bindung an sich und die Stabilität des Flavoproteins.

Die genannten Nachteile könnten vermieden werden, wenn der Einbau des Flavinderivats während der Expression des Flavoproteins stattfindet. Mit dieser Strategie konnte die menschliche Monoamin-Oxidase in einer Riboflavinbiosynthese-defizienten *S. cerevisiae rib5Δ* Mutante mit nicht-natürlichen Cofaktoren beladen werden (171). Voraussetzung dafür ist, dass der Expressionswirt über ein Transportsystem verfügt, um ein von außen zugegebenes Riboflavinderivat effizient aufnehmen zu können. Durch Expression von *ribM* ist *E. coli*, der am häufigsten verwendete Organismus für heterologe Proteinexpression, erstmals in der Lage, zugegebene Flavine aufzunehmen. Als Modell-Protein wurde Dodecin aus *Mycobacterium tuberculosis* gewählt, das mit 68-71 Aminosäuren pro Monomer das bislang kleinste Flavoprotein darstellt und dessen zwölf identischen Untereinheiten in der Form einer hohlen Kugel angeordnet sind (18, 73). Das dodecamere Apoprotein wird durch die Zusammenlagerung von vier Trimeren gebildet, die an ihren Kontaktflächen insgesamt sechs Bindestellen für Flavindimere formen. Dabei erfolgt die Bindung durch die Ausbildung einer „aromatischen Tetrade“, in der zwei Flavine zwischen zwei Tryptophanseitenketten eingelagert werden. Die Größe der Bindungstasche ist optimal für Flavine ohne Ribitylseitenkette, wie Lumichrom oder Lumiflavin. Auch Riboflavin und FMN werden, im Gegensatz zu FAD, gut gebunden. Dieses kann trotz seiner Größe eine aromatische Tetrade ausbilden, allerdings nur als Monomer und unter Beteiligung des Adeninrestes (72). Die große Menge an Riboflavin, die pro Molekül Dodecin gebunden werden kann, sollte später eine effiziente Isolierung und Quantifizierung des Chromophors erlauben. Die Bestimmung der Kristallstruktur von Dodecin aus *Thermus thermophilus* ließ Coenzym A als weiteren möglichen Liganden *in vivo* identifizieren. Demnach scheinen Dodecine nicht nur Flavin-bindende, sondern möglicherweise generell Cofaktor-bindende Proteine darzustellen (166).



### I.C.3.2.1. Co-Expression von *ribM*-3HA und Dodecin-6His in BL21(DE3)

Zur einfachen Reinigung von Dodecin über eine Ni-NTA Matrix wurde es C-terminal 6His-markiert. *E. coli* BL21(DE3) wurde mit pET21a(+)-*ribM*-3HA und pET28a(+)-Dodecin-6His co-transformiert (im Nachfolgenden als BL21-PD bezeichnet) und auf Chloramphenicol, Ampicillin und Kanamycin selektiert. Dodecin-exprimierende Zellen bildeten auf 2TY Platten intensiv gelb gefärbte Kolonien, was einen ersten Hinweis auf die Expression von Dodecin und den Einbau von Riboflavin gab. Die Analyse des Zellextrakts von BL21-PD durch Western Blot Analyse ließ beide Proteine nachweisen (Abb. 1.24). Dodecin ist dabei als schwache niedermolekulare Bande unter 10 kDa sowie als dominante Bande im Bereich zwischen 50 bis 100 kDa sichtbar. Diese repräsentieren sehr wahrscheinlich die monomeren (berechnetes Molekulargewicht von Dodecin-6His: 8,5 kDa) bzw. die teilweise denaturierte, hexamere (51 kDa) oder nicht denaturierte, dodecamere (102 kDa) Form von Dodecin. Obwohl sie in SDS-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Gellauf für 5 min bei 95°C inkubiert wurden, besitzen die Oligomere des mesophilen Organismus *M. tuberculosis* eine enorme Hitze- und SDS-Beständigkeit, welche bereits für das thermophile Bakterium *T. thermophilus* gezeigt wurde (166).



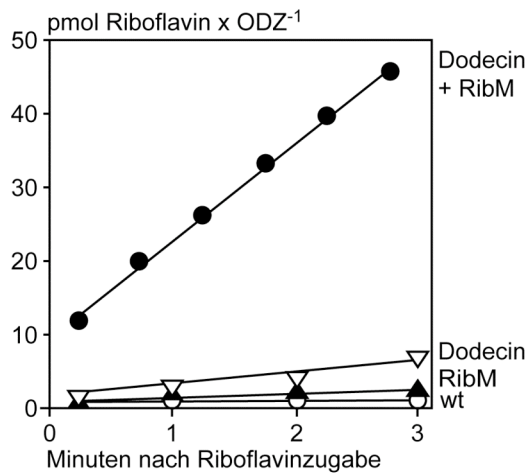
**Abb. 1.24. Co-Expression von *ribM* und Dodecin in *E. coli*.** *E. coli* BL21(DE3) wurde mit den Plasmiden pET21a(+)-*ribM*-3HA und pET28a(+)-Dodecin-6His co-transformiert und in M9 Minimal Medium angezogen. Nach Induktion mit 1 mM IPTG bei OD<sub>600</sub> = 0,5 und 4 Std. Wachstum bei 37°C wurde der Zellextrakt im Western Blot mit HA-probe (sc-805) und Penta-His mouse monoklonal Antikörper analysiert.

### I.C.3.2.2. Die Expression von Dodecin steigert die Riboflavinaufnahme

Bevor der Versuch unternommen wurde, das Flavoprotein Dodecin mit Roseoflavin zu beladen, wurden die Transportaktivitäten der Stämme BL21-RD, BL21-R (*ribM*) und BL21-D (Dodecin) im Vergleich zu Wildtypzellen untersucht. Dabei wurden Wildtyp, BL21-R und BL21-D mit einem leeren pET21a(+) bzw. pET24a(+) co-transformiert, um für alle Stämme identische Anzuchtbedingungen zu erhalten. BL21-R zeigte eine kontinuierliche Aufnahme (0,7 pmol ODZ<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), verglichen mit Kontrollzellen (0,1 pmol ODZ<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). Die Co-Expression von Dodecin führte zu einem drastischen Anstieg der Aktivität auf 13 pmol ODZ<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, was einer rund 18fachen Steigerung gegenüber BL21-R entspricht. Auch BL21-D Zellen besaßen eine erhöhte Aufnahmeaktivität



( $1,9 \text{ pmol ODZ}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (Abb. 1.25). Aufgrund der Expression von Dodecin wurde das in der Zelle vorhandene Riboflavin gebunden und damit dem Transportgleichgewicht entzogen. Dadurch entstand ein nach innen gerichteter Gradient, der zu einem Einstrom von Riboflavin in die Zellen führte. Dies war in Anwesenheit von RibM deutlich sichtbar, aber auch schwach in Zellen, die den Transporter nicht besaßen.

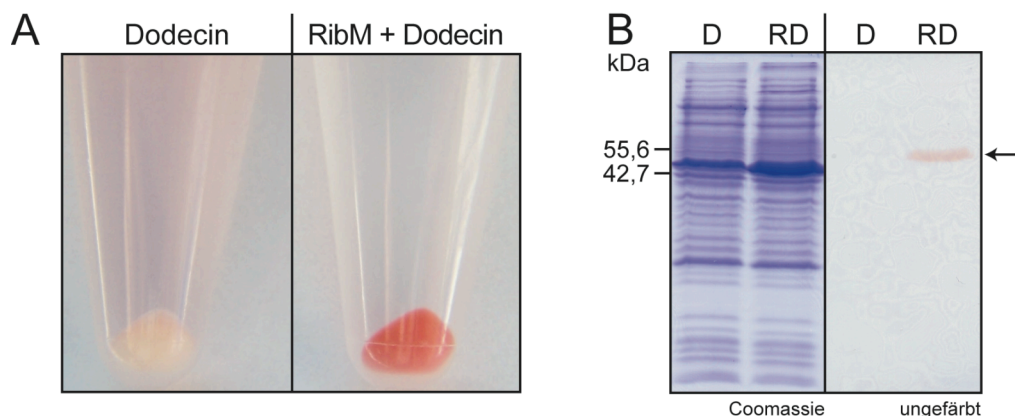


**Abb. 1.25. Die Expression von Dodecin steigert die Riboflavinaufnahme in *E. coli*.** *E. coli* BL21(DE3) (wt), BL21-R (RibM), BL21-D (Dodecin) und BL21-RD (Dodecin + RibM) wurden in M9 Minimal Medium angezogen, bei einer  $OD_{600} = 0,6$  mit 1 mM IPTG induziert und nach vier weiteren Stunden Inkubation in Aufnahmetests mit [ $^{14}\text{C}$ ]Riboflavin (Anfangskonzentration im Test  $2,2 \mu\text{M}$ ) eingesetzt.

### I.C.3.2.3. Der Einbau von Roseoflavin und [ $^{14}\text{C}$ ]Riboflavin in Dodecin

#### Roseoflavin

Kulturen von BL21-RD und BL21-D in M9 Medium wurden zeitgleich zur Induktion mit  $5 \mu\text{M}$  Roseoflavin versetzt und für weitere sechs Stunden geschüttelt. Die Aufnahme von Roseoflavin war bereits an der Farbe von Zellpellet und Kulturüberstand nach dem Ernten sichtbar. Die Zellen mit dem Riboflavintransporter RibM waren durch den aufgenommenen Chromophor rot gefärbt (Abb. 1.26 A)

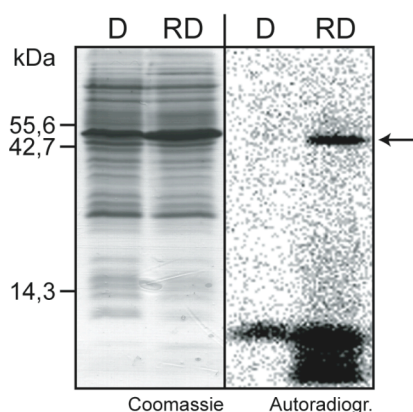


**Abb. 1.26. RibM vermittelt den Einbau von Roseoflavin in Dodecin.** BL21-D oder BL21-RD wurden in M9 Minimal Medium angezogen. Zeitgleich zur Induktion bei  $OD_{600} = 0,6$  mit 1 mM IPTG wurden die Kulturen mit  $5 \mu\text{M}$  Roseoflavin versetzt und für weitere 6 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. (A) Farbe des Überstandes und des Zellpellets nach Ernten der Kulturen. (B) Die Zellextrakte von BL21-D und BL21-RD wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Pfeil markiert die Bande des möglichen hexameren Dodecin-Roseoflavin Komplexes. Das SDS-Gel ist vor (rechts) und nach Coomassie-Färbung (links) gezeigt.

Die Zellextrakte der Kulturen wurden durch anschließende SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Gellauf war eine rote Bande mit den Laufeigenschaften des hexameren Dodecins in der Spur von BL21-RD sichtbar, die unter saueren Bedingungen, wie z.B. durch Coomassiefärbung, verschwand (Abb. 1.26 B).

### $[^{14}\text{C}]$ Riboflavin

Die Expression von Dodecin erfolgte in den Kulturen BL21-RD und BL21-D in Gegenwart von  $1,6\text{ }\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ Riboflavin. Um den Einbau des  $[^{14}\text{C}]$ Riboflavins zu untersuchen, wurde das zu analysierende SDS-Gel nicht gefärbt und ohne Waschschrift getrocknet, um eine Ablösung des Chromophors zu verhindern. Die Auswertung mithilfe eines Phosphoimagers ließ in beiden Stämmen die radioaktive Markierung von Proteinen erkennen. Analog zur Expression in Gegenwart von Roseoflavin konnte im Stamm BL21-RD der Einbau des  $[^{14}\text{C}]$ Riboflavins in ein rund 50 kDa großes Protein nachgewiesen werden, das dem hexameren Dodecin entsprechen sollte. Daneben waren sowohl in BL21-RD als auch in BL21-D Proteinbanden im Bereich  $<10\text{ kDa}$  sichtbar, deren Zuordnung nicht geklärt werden konnte (Abb. 1.27). Nach Auswertung des Autoradiogramms muss infrage gestellt werden, ob es sich bei der rund 8 kDa großen Proteinbande in Dodecin-exprimierenden Zellen um die monomere Form des Dodecins handelt (siehe Western Blot, Abb. 1.24). Die hydrophobe Flavin-Bindetasche mit durch eine aromatische Tetrade an der Kontaktfläche zweier Monomere gebildet. In der monomeren Form wäre sie der wässrigen Phase zugewandt und demzufolge sehr wahrscheinlich nicht in der Lage, ein Flavin zu binden. Demnach könnte es sich nur um ein Dodecin-Oligomer (Dimer, Trimer) handeln, das aufgrund seiner Kompaktheit ein anderes Laufverhalten im SDS-Gel zeigt, als erwartet. Die schwache Aufnahme von Riboflavin in Dodecin-exprimierende BL21-D Zellen ohne Transporter RibM (Abb. 1.25) erklärt, wieso auch in diesen Zellen ein  $[^{14}\text{C}]$ Riboflavin-markiertes Protein nachgewiesen werden konnte. Bei den niedermolekularen Banden, die nur in BL21-PD auftraten, könnte es sich um endogene Flavoproteine handeln, welche durch die erhöhte Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ Riboflavin durch RibM stärker mit radioaktiven Flavinen modifiziert wurden.



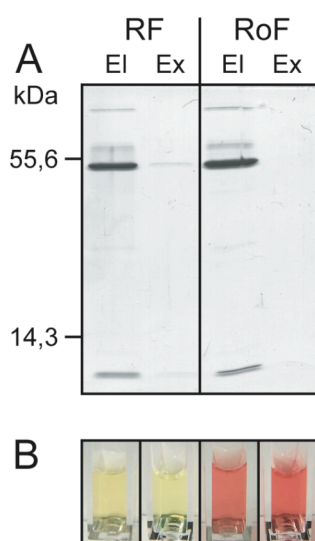
**Abb. 1.27. RibM vermittelt den Einbau von  $[^{14}\text{C}]$ Riboflavin in Dodecin.** Die Anzuchtbedingungen für BL21-D und BL21-RD waren dieselben wie in Abb. 1.32 geschildert. Zeitgleich zur Induktion wurden die Kulturen mit  $1,6\text{ }\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ Riboflavin versetzt. Nach Auftrennung der Zellextrakte durch 15% SDS-PAGE wurde ein Gel Coomassie-gefärbt, das andere ohne Waschschrift getrocknet, für 6 Std. auf einem Multipurpose-Screen exponiert und mittels eines Phosphoimagers analysiert.

In beiden Fällen wurde die starke Bindung der Flavine Roseoflavin und [ $^{14}\text{C}$ ]Riboflavin an das Dodecin sichtbar, die nicht durch Hitzedenaturierung in SDS-Probenpuffer aufgehoben wurde. Im Gegensatz dazu führten bereits saure Bedingungen (10% Essigsäure) zur Ablösung des Flavins.

#### I.C.3.2.4. Die Isolierung der gebundenen Chromophoren

*E. coli* BL21(DE3) ist in der Lage, Riboflavin zu synthetisieren. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch endogenes Riboflavin in Dodecin eingebaut wird und somit ein Chromophorengemisch vorliegt. Um die gebundenen Flavine zu identifizieren und ihre relativen Anteile zu bestimmen, mussten die Chromophore zunächst aus dem Dodecin-Komplex herausgelöst werden. Dazu wurden zwei 50-ml Kulturen von BL21-RD in M9 Medium nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Riboflavin bzw. Roseoflavin versetzt. Die Anzucht fand im Dunkeln statt, um einer Degradation der Flavine durch Licht vorzubeugen. Nach fünf Stunden wurden die Kulturen geerntet und das Dodecin über seinen 6His-Tag mithilfe einer Ni-NTA Matrix aus dem Zellextrakt gereinigt.

Die Affinität von Riboflavinbindung an Dodecin zeichnete sich durch große Hitzestabilität und Säurelabilität aus. Trotzdem wurde in Vorversuchen die Effizienz eines Hitzeschritts zur Extraktion des Chromophors unter denaturierenden Bedingungen getestet, um einen möglichen Abbau der Flavins im sauren Milieu zu verhindern. Im Hauptversuch wurden dazu die 5-ml Elutionsfraktionen nach sechsstündiger Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl mit Ethanol versetzt (Endkonzentration 80%) und 10 min bei 98°C inkubiert. Eine anschließende Ultrazentrifugation trennte die hitzedenaturierten Proteine ab. Diese bildeten ein noch leicht gelbliches bzw. rötliches Pellet, was darauf hindeutete, dass die Chromophoren nicht vollständig extrahiert wurden. Die Überstände wurden durch Lyophilisation auf 1/10 ihres Volumens (2 ml) eingeeengt und besaßen eine intensive Gelb- bzw. Rotfärbung (Abb. 1.28 B).



**Abb. 1.28. Extraktion der Chromophoren Riboflavin und Roseoflavin aus Dodecin.** (A) Dodecin-6His, beladen mit Riboflavin (RF) oder Roseoflavin (RoF), wurde mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl über eine Ni-NTA Matrix gereinigt. Die bei einer Konzentration von 30 mM gewonnenen Eluatfraktionen wurden 6 Std. gegen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl dialysiert und mit EtOH versetzt, sodass die Endkonzentration 80% betrug. Nach einem Hitzeschritt für 10 min bei 98°C wurden die denaturierten Proteine durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Eluatfraktionen (EI) und Chromophorenextrakte (Ex) wurden durch 15% SDS-PAGE analysiert. (B) Abbildung der entsprechenden Eluatfraktionen und proteinfreien Extrakte.

Die SDS-PAGE bestätigte eine erfolgreiche Isolierung der Chromophore, da die Extrakte im Vergleich zu den Elutionsfraktionen nahezu keine Dodecin- oder andere Proteinverunreinigungen mehr enthielten (Abb. 1.28 A).

### I.C.3.2.5. Die Quantifizierung der Chromophore

Die Konzentration der Dodecin-Monomere in den Eluatfraktionen wurde durch die Absorption bei 280 nm unter Verwendung des berechneten Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 6970 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Die Auftrennung und Quantifizierung der Extrakte mittels HPLC, deren Ergebnis in Tabelle 1.1 dargestellt ist, wurde von Dr. Simon Grill und Prof. Dr. Matthias Mack an der Hochschule Mannheim durchgeführt.

Dodecin aus Zellen angezogen in				
	Riboflavin		Roseoflavin	
Dodecin Monomere <sup>1)</sup>	235 $\mu\text{M}$		223 $\mu\text{M}$	
Extrahierte Chromophoren <sup>2)</sup>				
Riboflavin	42 $\mu\text{M}$	91%	3 $\mu\text{M}$	4%
Roseoflavin	n.d. <sup>3)</sup>		76 $\mu\text{M}$	96%
FMN	2,8 $\mu\text{M}$	6%	n.d. <sup>3)</sup>	
FAD	1,4 $\mu\text{M}$	3%	n.d. <sup>3)</sup>	

**Tab. 1.1. Analyse der in Dodecin eingebauten Flavine.** Die Identifizierung und Quantifizierung der Flavine erfolgte mittels HPLC.

<sup>1)</sup> Die Konzentration des Dodecins wurde bei 280 nm unter Verwendung des berechneten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 6970 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) für das Monomer bestimmt.

<sup>2)</sup> Die in der Tabelle angegebenen Konzentrationen sind um den Faktor 2 korrigiert. Da die Ausbeute der Extraktion nur rund 50% betrug, wurden die tatsächlichen Ergebnisse der Analyse verdoppelt.

<sup>3)</sup> n.d.: nicht detektiert

Die Analyse ergab, dass Dodecin, welches in Gegenwart von Riboflavin exprimiert wurde, zu rund 90% mit Riboflavin beladen war. Es enthielt nur geringe Mengen an FMN und FAD, die entweder durch Verstoffwechselung des aufgenommenen Riboflavins oder durch Biosynthese entstanden waren. Wurde Dodecin in Anwesenheit von Roseoflavin exprimiert, war fast ausschließlich ein Einbau des Analogons zu beobachten und der Anteil des endogenen Riboflavins mit 4% verschwindend gering.

Die Beladung von Dodecin mit den Chromophoren wurde durch die während der Expression anwesende Stoffmenge an Riboflavin bzw. Roseoflavin limitiert. Da sie nicht im Überschuss vorhanden war, waren insgesamt nur rund 20% (Riboflavin) bzw. 35% (Roseoflavin) der Bindestellen mit Flavinen besetzt. Berücksichtigt man die Gesamtbeladung (35%), hieße dies, dass nur jeder

35. Chromophor (4% von 35%) Riboflavin war oder jedes dritte Dodecamer ein Molekül Riboflavin trug (unter der Voraussetzung, dass alle Bindestellen besetzt waren). Dodecin konnte somit erfolgreich mit dem Riboflavinanalogon beladen werden und die Expression in Anwesenheit eines Überschusses des Analogons sollte zu einem nahezu vollständigen Einbau ausschließlich des nicht-natürlichen Flavins führen.

## **I. D.            Diskussion**

Die Flavine FMN und FAD, die katalytisch aktiven Formen von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) sind aufgrund ihrer chemischen Struktur vielseitige Cofaktoren, die eine wichtige Rolle bei Redoxreaktionen im Stoffwechsel spielen. Das ausgedehnte und konjugierte  $\pi$ -System des Isoalloxazinrings erlaubt außerdem die Absorption von sichtbarem Licht im kurzwelligen Bereich, wodurch bestimmte Flavoproteine die Fähigkeit erhalten, Licht in ein zelluläres Signal zu übersetzen.

### **I.D.1.            Die bakteriellen Riboflavintransporter YpaA und RibM**

#### **I.D.1.1.        Riboflavintransporter besitzen unterschiedliche Ursprünge**

Lediglich Pflanzen, Pilze und die meisten Mikroorganismen sind in der Lage, Riboflavin zu synthetisieren. Manchen von ihnen gelingt dies sogar in solch großen Mengen, dass sie für die biotechnologische Produktion von Riboflavin verwendet werden. Für andere Lebewesen, z.B. manche *Lactobacillen* oder für Säuger, ist Riboflavin ein essentieller Wachstumsfaktor, den sie mit der Nahrung aufnehmen müssen. Dafür besitzen sie spezifische Transportmechanismen, die in Bakterien, Pilzen und Säugern bereits gut charakterisiert wurden (30, 35, 64, 217, 266). Die verantwortlichen Proteine sind jedoch in den meisten Fällen noch immer unbekannt. Das Protein Mch5 aus *S. cerevisiae* war das erste, dem eine Beteiligung am Riboflavintransport eindeutig zugewiesen werden konnte (210). Es bildet mit vier weiteren Mitgliedern (Mch1-4) eine Familie von Membranproteinen, die der „Major Facilitator Superfamily“ angehören und eine schwache Homologie zu den menschlichen Monocarboxylattransportern besitzen. Mit dem Protein BCRP (breast cancer resistance protein) wurde der erste Riboflavintransporter aus Säugern identifiziert. Er gehört zur Familie der ABC (ATP Binding Cassette) Transporter und besitzt keine Homologie zu Mch5, welches Riboflavin durch den Mechanismus der erleichterten Diffusion in die Zellen transportiert. Als Exporter mit einer breiten Substratspezifität trägt BCRP zur Detoxifikation der Zellen bei. Während der Schwangerschaft und der Stillzeit wird Bcrp1 hauptsächlich in den Zellen der Brustdrüse exprimiert, wo sein Genprodukt für die Anreicherung der Muttermilch mit Riboflavin verantwortlich ist (260). Beide eukaryotischen Riboflavintransporter besitzen keine signifikante Homologie zu ihren analogen bakteriellen Proteinen und sind demnach unabhängig davon im Laufe der Evolution entstanden.

Die Genfamilien *ypaA*, *ribM*, *impX* und *rfnT*, die für mögliche bakterielle Riboflavintransporter kodieren, wurden mithilfe von Genomanalysen aufgrund hoch-konservierter RFN-Elemente in ihren 5'-nicht-translatierten Bereichen identifiziert (263). Dies verdeutlicht das große Potential der Bioinformatik, unbekannten Genen aufgrund von Homologiestudien eine mögliche Funktion zuzuordnen zu können. Eine Überprüfung dieser Voraussagen durch biochemische Methoden ist aber zwingend

notwendig, um beispielsweise die Substratspezifität eines Transportproteins eindeutig zu klären. In dieser Arbeit konnten YpaA aus *B. subtilis* und RibM aus *C. glutamicum* als die ersten bakteriellen Riboflavintransporter identifiziert werden. Zeitgleich dazu wurde von Burgess et al. (30) RibU als ein weiterer Vertreter der YpaA-Familie aus *L. lactis* kloniert, der die Aufnahme von Riboflavin vermittelt.

Die Mitglieder der YpaA-Familie, die vier bis sechs Transmembrandomänen (TMDs) besitzen und fast ausschließlich innerhalb des Stammes der Firmicutes zu finden sind, bilden die RFT (Riboflavintransporter) Subfamilie innerhalb der BART Superfamilie, zu der auch die Familie der Sensor Histidin Kinasen (SHK) zählt. Deren Struktur wird von sechs TMDs determiniert, an die sich eine C-terminale, cytosolische Kinasedomäne anschließt. Homologieanalysen zufolge weist das Strukturelement zwischen TMDs 2 und 6 eine hohe Ähnlichkeit zur 5-TMD Einheit von YpaA auf. Deshalb wurde auch eine cytoplasmatische Lokalisation des C-Terminus von YpaA postuliert (Abb. 1.8, (156)), was in dieser Arbeit durch GFP-, LacZ- und PhoA-Fusionen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Ein besonderes Charakteristikum von YpaA ist seine hohe Hydrophobizität. Rund zwei Drittel der Aminosäuren (63%) liegen innerhalb der TMDs vor. Die beiden extrazellulären Loops zwischen TMD2/3 sowie TMD4/5, die für eine Substratbindung in Frage kommen, sind mit rund 17 bis 20 Aminosäuren deutlich länger als die rund 6 Aminosäure langen cytoplasmatischen Loops zwischen TMD1/2 sowie TMD3/4. Während die Aminosäuresequenzen der YpaA-Proteine insgesamt sehr homolog zueinander sind (23-60% Identität), ist der extrazelluläre Loop zwischen den TMDs 4 und 5 bezüglich Sequenz und Länge weniger stark konserviert (Abb. 1.8 A).

Im Gegensatz dazu besitzt RibM mit seinen putativen sieben Transmembranspannen weder auf Ebene der Primär- noch der Sekundärstruktur Ähnlichkeiten zur YpaA-Familie, wohl aber zur Familie der PnuC Transporter (Abb. 1.20). Diese zeichnen sich durch eine breite Substratspezifität aus und umfassen neben den Nicotinamidribosid-Transportern (PnuC), die in den Gram-negativen Pathogenen *Haemophilus influenzae* und *Salmonella typhimurium* näher charakterisiert wurden (81, 222, 293, 294), auch putative Thiamintransporter (PnuT) und Transporter für Desoxyribonukleotide (PnuN). Sie alle werden durch Repressoren (NadR [PnuC], NrdR [PnuN]) oder regulatorische Elemente in ihren 5'-nicht-translatierten Bereichen (RFN- [RibM], THI-Riboswitch [PnuT]) zusammen mit den Biosynthesegenen des jeweiligen Stoffwechselwegs co-reguliert. Mitglieder der PnuC Familie katalysieren die Aufnahme von nicht-phosphorylierten Metaboliten (Nicotinamidribosid, Thiamin, Desoxyribonukleotide und Riboflavin), die anschließend durch entsprechende cytosolische Kinasen phosphoryliert werden, um einen Efflux des Substrats zu verhindern (68). Daneben ist RibM zu rund 34% mit SdRibM aus *Streptomyces davawensis* (in dieser Arbeit als SdRibM bezeichnet) identisch. Da das Gen *SdribM* innerhalb des Operons der Riboflavinbiosynthesegene liegt und SdRibM in der Lage war, den Wachstumsdefekt riboflavinauxotropher *E. coli* Stämme zu komplementieren, wurde es als Riboflavintransporter postuliert (71).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich Transportsysteme für die Aufnahme von Riboflavin im Laufe der Evolution mehrmals unabhängig voneinander entwickelt haben. Dabei ist bemerkenswert, dass selbst innerhalb der Domäne der Bakterien diese Mechanismen und Transportproteine nicht konserviert sind.

### **I.D.1.2. YpaA und RibM besitzen unterschiedliche Transportmechanismen**

Bakterien besitzen unterschiedlichste Transportmechanismen, um Vitamine aus der Umgebung aufzunehmen. So werden Thiamin (86, 214, 276), Vitamin B<sub>12</sub> (145) und Biotin (78) von Mitgliedern der ABC Superfamilie transportiert, Vitamin C (290) mithilfe eines Phosphotransferasesystems und Panthotenat durch Natriumsymport (259).

Cecchini et al. (35) beschrieben die Riboflavinaufnahme in *B. subtilis* als hoch-affines und energieabhängiges System, welches einen  $K_m$ -Wert von 5 bis 20 nM besitzt. Dabei charakterisierten sie vermutlich das Protein YpaA, welches in dieser Arbeit durch Überexpression und Deletion seines Gens als hoch-affiner Riboflavintransporter identifiziert werden konnte.

Nimmt man an, dass YpaA das einzige Transportsystem und Riboflavin-bindendes Membranprotein in *B. subtilis* darstellt, könnte ihm eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 10-30 nM zugeschrieben werden (34). YpaA ist ein ähnlich hoch-affines Transportprotein wie sein Homologes RibU, welches einen  $K_D$ -Wert von rund 0,6 nM besitzt. Damit gehört RibU zu denjenigen Transportern, die die höchsten Substrataffinitäten besitzen (56). Das starke Bindungsvermögen ist notwendig, um das in der Natur nur in geringen Mengen (nämlich im nanomolaren Bereich) vorkommende Riboflavin effektiv aufnehmen zu können (24).

YpaA transportiert sein Substrat energieabhängig durch Protonensymport (Abb. 1.17) und ist damit der erste Transporter, der eine aktive Aufnahme von Riboflavin in die Zellen vermittelt. Obwohl für RibU aus *L. lactis* der Mechanismus eines Facilitators vorgeschlagen wurde (30), scheint es aufgrund der hohen Homologie von RibU zu YpaA jedoch unwahrscheinlich, dass beide Proteine unterschiedliche Transportmechanismen nutzen. Deshalb soll die Natur der RibU-vermittelten Riboflavinaufnahme in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

Damit unterscheidet sich die YpaA-Familie auch auf biochemischer Ebene deutlich von RibM, das Riboflavin durch erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten transportierte. *In vivo* vermittelt es sehr wahrscheinlich den Import von Riboflavin in die Zellen. Die Abwesenheit von Glucose bzw. die Anwesenheit von Protonophoren hatte, verglichen mit YpaA, keine Auswirkung auf die Aufnahmeaktivität. Die Transporter im Verdauungstrakt von Säugern nehmen Riboflavin ebenfalls durch erleichterte Diffusion auf. Dennoch ist der Prozess energieabhängig. Gastaldi et al. (67) konnten an Ratten zeigen, dass die Energie für die Phosphorylierung von Riboflavin zu FMN benötigt wird, um das Substrat daran zu hindern, die Zelle über den Facilitator wieder zu verlassen. Dieser Mechanismus wird auch als „metabolic trapping“ bezeichnet. Die Charakterisierung von RibM



erfolgte durch heterologe Expression in *E. coli*, die mithilfe des Transporters zur Akkumulation von Riboflavin fähig waren. Da zu Beginn der Aufnahmetests ein hoher, in die Zellen gerichteter Konzentrationsgradient für Riboflavin herrschte und die Aufnahmeaktivität nur für die ersten Minuten bestimmt wurde, lassen sich keine Rückschlüsse auf die Notwendigkeit der Phosphorylierung von Riboflavin in *C. glutamicum* bzw. einen eventuellen Austritt aus den Zellen ziehen. Dennoch ist anzunehmen, dass Riboflavin auch dort nach seiner Aufnahme in FMN umgewandelt wird und so in der Zelle verbleibt.

Auf das „metabolic trapping“ von Riboflavin sind *B. subtilis* Zellen nicht angewiesen. Sie verwenden die Energie bereits für den Transportprozess, indem sie mit der Elektronentransportkette die protonenmotorische Kraft über der Membran aufrechterhalten, mithilfe der das Riboflavin transportiert wird. Dennoch wurde unter anderem auch in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Riboflavin kurz nach seiner Aufnahme nicht in der freien Form, sondern als FMN oder FAD vorliegt (Abb. 1.11, (35)). Der Transportprozess ist also zeitlich und eventuell auch funktionell an die Phosphorylierung von Riboflavin gekoppelt. Eine wichtige Rolle bei der Aufnahme scheint auch die Riboflavinkinase/FAD Synthetase RibC zu spielen, wie es schon Cecchini et al. (35) vermuteten. Mutanten, in denen die RibC-Aktivität durch eine Punktmutation nur noch 1% der Wildtypaktivität betrug, zeigten eine stark verminderte Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]Riboflavin und keine Akkumulation von FMN und FAD (Abb. 1.11 B). Damit ließe sich allerdings nicht die fehlende Transportaktivität von YpaA in *E. coli* Zellen erklären, da diese ebenfalls eine bifunktionelle Riboflavinkinase/FAD Synthetase (RibF) besitzen, die zu 35% mit RibC identisch ist. Die fast gleichzeitige Phosphorylierung des Substrats ließ zunächst vermuten, dass Riboflavin über ein spezifisches Phosphotransferasesystem (PTS) aufgenommen wird, in dem YpaA als Homo- oder Heterodimer die Membrankomponente bildet. Das konnte aber nicht bestätigt werden, da eine Mutante, in der das zentrale Enzym HPr nicht funktionell ist, hinsichtlich der Riboflavinaufnahme nicht beeinträchtigt war (Abb. 1.12). Neben der Aufrechterhaltung des Protonengradienten über die Membran wird ein Teil der Energie, die für den Transport von Riboflavin benötigt wird, vermutlich auch in *B. subtilis* für die Phosphorylierung von Riboflavin aufgewendet, jedoch nicht dafür, das Substrat am Austritt aus der Zelle zu hindern, sondern um den Transportvorgang zu ermöglichen. Die hohe Affinität von Riboflavin zu YpaA stellt eine Herausforderung an den Transporter dar, sein Substrat auf der cytosolischen Seite der Membran wieder freizugeben. Dies könnte durch eine niedrigere Affinität der intrazellulären Riboflavin-Bindestelle und/oder durch die Aktivität der Flavokinase RibC ermöglicht werden. RibC könnte einerseits mit einer hohen Affinität ihrerseits dafür sorgen, dass die intrazelluläre Konzentration an freiem Riboflavin weit unter der Dissoziationskonstante liegt, was das Ablösen des YpaA-gebundenen Riboflavins erleichtern würde. Zum anderen könnte RibC durch Phosphorylierung des YpaA-gebundenen Riboflavins zu FMN und eventuell zu FAD die Affinität zum Transporter erniedrigen und würde dadurch aktiv zur Freigabe des Substrats beitragen. Im Gegensatz zu Riboflavin besitzt das Homologe RibU eine rund 60fach niedrigere Affinität zu FMN und keine Affinität zu FAD (56). Wie

im nächsten Kapitel geschildert wird, wirkte FAD auch nicht als Inhibitor der Riboflavinaufnahme durch YpaA und scheint demnach nicht von ihm gebunden zu werden. Dieses Modell würde die starke Abhängigkeit des Transports von der Phosphorylierung und die wichtige Rolle von RibC am Transportprozess erklären.

### **I.D.1.3. Die Substratspezifität von YpaA und RibM**

Trotz der Unterschiede in Sequenz und Transportmechanismus besaßen YpaA und RibM eine ähnliche Substratspezifität. Diese war stark begrenzt auf Riboflavin und Roseoflavin, das trotz seines modifizierten Isoalloxazinrings für beide Proteine ein ebenso gutes Substrat war wie Riboflavin selbst. Während der Cofaktor FMN besser und FAD schlechter in der Lage waren, die Riboflavinaufnahme über YpaA zu inhibieren, hatten sie keinen Einfluss auf RibM, ebenso wenig wie Riboflavinanaloga ohne Ribityl-Seitenkette (Abb. 1.15, 1.22).

Das Potential der Riboflavinderivate und -analoga, als Inhibitoren zu wirken, spiegelte sich auch in Wachstumstests wider. Die schwache Inhibierung der Riboflavinaufnahme durch FMN und FAD könnte bedeuten, dass beide Flavine von YpaA transportiert wurden. Die Tatsache, dass FMN und FAD auch das Wachstum der Biosynthesemutante *ΔribB* komplementieren konnten, würde dies bestätigen. Allerdings beweist dies nicht die aktive Aufnahme von FMN und FAD in *B. subtilis*. Viele Cofaktoren können nur dann in die Zellen aufgenommen werden, wenn sie zuvor durch Pyrophosphatasen sowie spezifische oder unspezifische extrazelluläre Phosphatasen hydrolysiert wurden. Dies würde durch die Arbeiten von Cecchini et al. (35) gestützt, in denen keine Aufnahme von [<sup>14</sup>C]FMN in *B. subtilis* Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Dauer des Tests war vermutlich zu kurz, um eine mögliche Phosphatase-Aktivität zu erkennen. In *Haemophilus influenzae* katalysiert das Enzym NadN beispielsweise die Umwandlung von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) zu Nicotinamidmononukleotid (NMN), das durch die Aktivität der extrazellulären sauren Phosphatase e(P4) weiter zu Nicotinamidribosid (NR) hydrolysiert wird (115). Da die NAD-Pyrophosphatase aus *H. influenzae* auch eine Aktivität für FAD besaß (108), wäre eine ähnliche Reaktion auch für die Flavine FMN und FAD denkbar. Zudem besitzt *B. subtilis* mit YfkN (2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase; bifunctional periplasmic precursor protein) ein sehr gutes Homologes zu NadN, das an der Deadenylierung und Hydrolyse von FAD bzw. FMN zu Riboflavin beteiligt sein könnte. In freies Riboflavin umgewandelt, könnten die Flavin-Cofaktoren so den Phänotyp der *ΔribB* Mutante heilen.

Die Riboflavin-überproduzierende *B. subtilis* Mutante *ribC82* wurde eingehend von Mack et al. (150) charakterisiert. Ihr Wachstumsphänotyp, dessen Ursache in der nahezu vollständig beeinträchtigten Synthese von FMN und FAD liegt, kann in Minimalmedium nicht durch die Gabe der Cofaktoren komplementiert werden, was ebenfalls gegen einen direkten Transport der beiden Flavine spräche. Wurde jedoch das Gen *FAD1* aus *S. cerevisiae*, dessen Genprodukt die Adenylierung von

FMN zu FAD katalysiert, in einer *ΔribC* Mutante exprimiert, war diese fähig, in Gegenwart von FMN, jedoch nicht in Gegenwart von FAD, zu wachsen. Da auch die deregulierte Riboflavinbiosynthese in der *ΔribC* Mutante durch externes FMN wieder reprimiert werden konnte, scheint FMN *per se* von *B. subtilis* aufgenommen zu werden. Riboflavin hingegen war dazu nicht in der Lage, da es zwar in die Zellen aufgenommen, aber aufgrund der fehlenden Flavokinaseaktivität nicht in den Effektor FMN umgewandelt werden konnte. Der Transport von FMN, nicht aber von FAD, stünde im Einklang mit den Bindungsstudien der beiden Cofaktoren an das YpaA-Homologe RibU. Während FMN, wenn auch deutlich schlechter als Riboflavin, von dem Transporter gebunden wurde, konnte keine Bindung von FAD nachgewiesen werden (56).

Im Gegensatz dazu konnte der Wachstumsdefekt einer *ribM*-exprimierenden, riboflavinauxotrophen *E. coli* Mutante weder in Gegenwart von FMN noch FAD komplementiert werden, was dafür spricht, dass beide Cofaktoren nicht von RibM transportiert werden (Abb. 1.21). Allerdings war dieses Ergebnis zugleich auch überraschend, da es in *E. coli* sehr gute Homologe zur Pyrophosphatase NadN gäbe, die eventuell die Umwandlung von FAD und FMN zu Riboflavin katalysieren und damit zur Komplementation des Wachstumsdefekts führen könnten. Die Expression von *ribM* in *B. subtilis* könnte helfen, die Substratspezifität von YpaA zu klären. Werden die Cofaktoren FMN und FAD direkt von *B. subtilis* aufgenommen, sollte *ribM* einen *ΔribB ΔypaA* Doppelknockout in Gegenwart der beiden Flavine nicht komplementieren können. Nimmt man allerdings an, dass sie in *B. subtilis* durch eine bislang unbekannte Enzymaktivität – die in *E. coli* fehlt – zu freiem Riboflavin abgebaut werden, sollte die Expression von *ribM* sehr wohl den Phänotyp einer *ΔribB ΔypaA* Mutante heilen.

In *S. cerevisiae* wurde ebenfalls der Transport von FMN und FAD über intrazelluläre Membranen nachgewiesen. Nachdem die Versorgung mitochondrieller flavinabhängiger Enzyme mit den Cofaktoren für lange Zeit ungeklärt blieb, scheinen sowohl Cytosol als auch die Mitochondrienmatrix Enzyme mit Flavokinaseaktivität sowie FAD-Synthetaseaktivität zu besitzen (6, 221, 285). Anders als in Bakterien liegen die Flavokinase und FAD Synthetase in *S. cerevisiae* nicht auf einem bifunktionellen Protein vereint. Die Flavokinase Fmn1 ist dabei mit einer N-terminalen Transmembrandomäne in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Das aus dem Cytosol aufgenommene Riboflavin kann so in der Mitochondrienmatrix in FMN und anschließend in FAD umgewandelt werden. Im Cytoplasma scheint Fmn1 als integrales Membranprotein in der äußeren Membran des Endoplasmatischen Retikulums vorzuliegen (221). Die genaue Funktion des mitochondriellen Transporters Flx1 (**F**lavin **E**xchange), der den Export von FAD aus der Mitochondrienmatrix in das Cytoplasma vermittelt, ist unklar (258). Eventuell übernimmt er die Rolle eines Sensors, der zwischen dem FAD-Gehalt der Mitochondrien und der cytoplasmatischen Biosynthese vermittelt. Die Proteine Flc1 und Flc2 sind für den Import von FAD in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich, wo es für die Ausbildung von Disulfidbrücken benötigt wird (204).

#### I.D.1.4. Der Export von Riboflavin

In der *B. subtilis* Mutante *ribCI* ist nicht nur das Riboflavinbiosyntheseoperon, sondern auch *ypaA* verstärkt exprimiert (137). Aufgrund der fehlenden Flavokinaseaktivität liegt das überproduzierte Riboflavin vermutlich in seiner freien, und nicht in der Cofaktor-Form, vor. Da der Kulturüberstand bereits nach nur wenigen Stunden deutlich mit Riboflavin angereichert war, stellte sich die Frage, auf welchem Weg es die Zellen verlässt. Prinzipiell denkbar wären entweder passive Diffusion oder Protein-vermittelter Export.

Einige Umstände ließen die zweite Möglichkeit wahrscheinlicher erscheinen. Die Zellen schieden das synthetisierte Riboflavin sehr schnell in das Medium aus. Würde dies durch passive Diffusion erfolgen, müsste es in einer sehr hohen intrazellulären Konzentration vorliegen. Dann aber sollte die Expression von *ribM* oder *SdribM* die Diffusion erleichtern und zu einer schnelleren und höheren Akkumulation von Riboflavin führen, was aber nicht der Fall war. Außerdem wurde mit BCRP aus Säugern das erste Transportprotein identifiziert, das eine Aktivität als Exporter besitzt und für die Anreicherung der Muttermilch mit Riboflavin verantwortlich ist (260). Ebenso wurde der aktive Export von Riboflavin in dem filamentösen, Riboflavin-überproduzierenden Pilz *Ashbya gossypii* nachgewiesen (64).

Trotz seiner erhöhten Expression und seiner Spezifität für Riboflavin scheint YpaA *per se* nicht für die vermehrte Ausscheidung von Riboflavin verantwortlich zu sein, da die Deletion von *ypaA* in einer überproduzierenden *ribCI* Mutante die Akkumulation von Riboflavin im Medium nicht beeinträchtigt. Überraschenderweise war eher das Gegenteil zu beobachten. Im Kulturüberstand einer *ribCI AypaA* Doppelmutante war die Riboflavinkonzentration rund 1,5fach höher als bei *ribCI* Zellen. Da das Experiment nur einmal durchgeführt wurde, müsste das Ergebnis zunächst auf seine Reproduzierbarkeit hin geprüft werden. Dennoch scheint es plausibel zu sein, zumal ein ähnlicher Effekt bei der Ausscheidung von Riboflavin durch *A. gossypii* beobachtet wurde (64). YpaA besitzt eine sehr hohe Affinität für Riboflavin und könnte deshalb und aufgrund seiner erhöhten Expression einen Teil des ausgeschiedenen Riboflavins hauptsächlich an die Zellen binden und evtl. auch wieder in die Zellen transportieren.

Falls Riboflavin durch einen Protein-vermittelten Prozess ausgeschieden wird, bleibt die Frage nach dem Exportsystem weiter offen. Seine Identifizierung könnte eine praktische Anwendung in der biotechnologischen Herstellung von Riboflavin oder in der Lebensmittelindustrie ermöglichen. Dort wird bereits daran gearbeitet, Nahrungsmittel mithilfe von modifizierten Milchsäurebakterien während des Fermentationsprozesses mit so genannten „Nutraceuticals“ (von „nutrition“ und „pharmaceutical“), wie Zuckeraus Austauschstoffe (Mannitol, Sorbitol) oder B-Vitamine, anzureichen. So könnte zum Beispiel Joghurt auf natürliche Weise und während des Herstellungsprozesses mit Riboflavin versetzt werden (29, 88, 89, 251).

### I.D.1.5. Die Regulation der Genexpression von *ypaA*

Ebenso wie das Riboflavin-Biosyntheseoperon besitzt auch *ypaA* ein RFN-Element im 5'-nicht-translatierten Bereich, das die Expression durch einen Riboswitch-Mechanismus kontrolliert. Während in Gram-positiven Bakterien *rib* Operons meist auf der Ebene der Transkription reguliert werden, um die unnötige Bildung von langen bicistronischen mRNAs zu vermeiden, wird die Expression einzelner Gene auf Translationsebene gesteuert. Das bedeutet, dass *ypaA* konstitutiv transkribiert wird. Die Bindung von FMN an die *rib leader* Sequenz führt zu einer alternativen Sekundärstruktur des RFN-Elements, wodurch die Shine-Dalgarno-Sequenz verdeckt und damit die Translation der *ypaA* mRNA inhibiert wird. Dadurch, dass die Expression des Riboflavintransporters in einem späteren Schritt reguliert wird als die Expression der Biosynthesegene, wird eine schnellere Bildung des Transporters und damit eine schnellere Antwort auf Riboflavinmangel ermöglicht (283). Eine klare Aussage darüber ließe sich jedoch nur durch einen Vergleich der  $K_D$ -Werte der beiden Riboswitches treffen, die die Expression des Riboflavinbiosynthese-Operons und von *ypaA* regulieren. Zudem konnte in Transkriptionsanalysen nachgewiesen werden, dass die Transkription von *ypaA* in einer deregulierten *ribC* Mutante, verglichen mit dem Wildtyp, rund 11fach gesteigert ist (137). Das Gen scheint somit sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Translation reguliert zu werden. Der genaue Mechanismus und die Beiträge beider Regulationsmöglichkeiten auf die *ypaA*-Expression wurden bislang nicht untersucht.

Die äußerst konservierten RFN-Elemente und teilweise auch die komplette Operonstruktur scheinen durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterienarten verbreitet worden zu sein. Dafür spricht, dass in Gram-negativen Bakterien oft unterschiedliche Einzelgene des Riboflavinbiosyntheseweges durch das RFN-Element kontrolliert werden (68). Außerdem besitzt das Gram-negative Bakterium *Actinobacillus pleuropneumoniae* ein *rib* Operon, das hohe Homologie mit dem Gram-positiver Bakterien aufweist (68). In den Bakterien *Photobacterium phosphoreum* und *Photobacterium leiognathi* befindet sich das *rib* Operon sogar innerhalb des *lux* Operons, dessen Genprodukte für die Lichterzeugung durch Biolumineszenz verantwortlich sind. Das spricht einerseits für die enge Kopplung der beiden Stoffwechselwege, stützt andererseits aber auch die Hypothese des horizontalen Gentransfers (136). Mithilfe der Biosynthesemutante *ΔribB* konnte die Funktionalität des RFN-Elements im upstream Bereich von *ypaA* bestätigt werden. Es bestand eine starke Abhängigkeit der Expression von *ypaA* von der externen Riboflavinkonzentration. Je mehr Riboflavin dem Medium zugegeben wurde, desto geringer war sowohl die Menge an YpaA in der Membranfraktion als auch die Transportaktivität für Riboflavin.

Die Biosynthese von Riboflavin unterliegt in vielen Organismen nicht nur der Kontrolle durch das Endprodukt FMN, sondern sie wird auch durch die Verfügbarkeit von Eisen kontrolliert. So wurde für die Bakterien *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejunii* ein enger Zusammenhang zwischen der Eisenaufnahme und der Riboflavinbiosynthese sowie dem Riboflavinexport gezeigt (44, 284).

Ebenso wird die Riboflavinbiosynthese in pilzlichen Riboflavinüberproduzenten durch die Anwesenheit von Eisen reprimiert bzw. die Ausscheidung von Riboflavin in Abwesenheit von Eisen induziert (49, 122, 268). Die gesteigerte Synthese und Ausscheidung von Riboflavin gewährleistet die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ , da es nur in dieser Form direkt von der Zelle aufgenommen werden kann. In *B. subtilis* und vielen anderen Mikroorganismen werden Gene, die eine wichtige Rolle im Eisenmetabolismus spielen, durch eine Fur-Box reguliert, die rund 50 bis 200 bp vor dem Startcodon liegt und eine Bindestelle für das Fur (Ferric uptake repressor) Protein darstellt. Eisen hatte in *C. jejunii* nicht nur Auswirkungen auf die Riboflavinbiosynthese, sondern auch auf den Riboflavintransport. Die Deletion des *fur* Gens führte dort zu einer erhöhten Aufnahmeaktivität für Riboflavin, was für eine Regulation durch Fur spricht (44). Etwa 90 bp upstream des RFN-Elements und damit des Transkriptionsstarts von *ypaA* (was 536 bp upstream des Startcodons entspricht) befindet sich eine nahezu perfekte Fur-Box. Sie unterscheidet sich von der Konsensussequenz lediglich darin, dass sich statt nur einer Base sieben Basen zwischen den Inverted Repeats befinden. Die An- oder Abwesenheit von Eisen in Form von Ammoniumeisencitrat hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Expression von *ypaA*. In der Sequenz des RFN-Elements ist ein sehr kurzer ORF (*ypzE*) mit nur 54 aa kodiert, dessen abgeleitete Proteinsequenz keine Homologie zu bestehenden Proteinen aufweist. Die putative Fur-Box besäße mit 169 bp die typische Entfernung von seinem Startcodon. Baichoo et al. (7) analysierten mithilfe von Transkriptionsanalysen die eisenabhängige Expression von Genen in *B. subtilis*, die weder für das Biosynthesoperon noch für *ypaA* oder *ypzE* nachgewiesen werden konnte (7). Dennoch besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Stressantwort, ausgelöst durch Metallionen, und der Expression von *ypaA*. In einer ähnlichen Analyse, in der die Genregulation in Abhängigkeit der Metallionen  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{As}^{5+}$  untersucht wurde, waren in 10  $\mu\text{M}$   $\text{As}^{5+}$  die Gene *ypaA* und *ypzE* jeweils 4fach bzw. 3,3fach induziert, nicht aber die Gene der Riboflavinbiosynthese (179). *B. subtilis* besitzt ein *ars* Operon, dessen Genprodukte das toxische Arsenat ( $\text{As}^{5+}$ ) zu Arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ) reduzieren und aktiv aus der Zelle transportieren (216, 231). Gerade die Verwandtschaft von YpaA zu Proteinen der Arsenical Resistance-3 Familie innerhalb der BART Superfamilie lässt eine Beziehung zwischen dem Riboflavintransport und der zellulären Antwort auf Arsenat wahrscheinlich erscheinen, wenn auch die mögliche Funktion von Riboflavin in der Detoxifikation von Arsenat nicht offensichtlich ist. Im Gegensatz zu den extrazellulären Eisenreduktasen handelt es sich bei den Arsenatreduktasen nicht um flavinabhängige Enzyme. Sie katalysieren die Umwandlung von Arsenat zu Arsenit mithilfe von Thioredoxin oder Glutaredoxin (167). Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Arsenat und der Expression von *ypaA* näher zu untersuchen, müsste zunächst das Ergebnis der Microarray-Analyse durch z.B. Promotorfusionen an Reporterproteine bestätigt werden.

## **I.D.1.6. Mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen von YpaA**

### **I.D.1.6.1. Die funktionelle Einheit von YpaA scheint ein Monomer zu sein**

YpaA gehört zusammen mit RibU zur RFT Familie innerhalb der BART-Superfamilie, zu der auch Transportproteine mit zehn Transmembranhelices (Acr3) zählen. Diese sind sehr wahrscheinlich durch Genduplikation der 5-TMD Einheit von YpaA entstanden, wobei die TMDs 1-5 der Acr3 Proteine die größere Homologie zu YpaA und dieselbe Orientierung aufweisen. Die TMDs 6-10 hingegen sind entgegengesetzt orientiert und besitzen nur mehr eine geringe Ähnlichkeit zu YpaA (156). Für den Transport von hydrophilen Molekülen über eine Membran ist es entscheidend, dass eine selektive Pore geschaffen wird, die das entsprechende hydrophile oder ionische Milieu erzeugt. Da YpaA nur aus fünf TMDs besteht und nur zwei extrazelluläre Loops besitzt, schien es unwahrscheinlich, dass es als Monomer die Selektivität für Riboflavin und den Transportprozess ermöglichen kann. Ein in der Literatur sehr gut beschriebenes Beispiel für einen oligomeren Transporter ist der Multidrug Transporter EmrE aus *E. coli*. Er besteht lediglich aus vier TMDs und ist nur als Homodimer in der Lage, toxische Verbindungen wie Ethidiumbromid durch Protonensymport aus der Zelle zu schleusen (205, 207, 240). Darüber hinaus sprach sowohl die Verwandtschaft zur Acr3-Familie als auch die Tatsache, dass die Sekundärstrukturen der meisten primären und sekundären Transporter zehn bis vierzehn Transmembranhelices enthalten (218) dafür, dass YpaA ein Homodimer bildet und nur als solches katalytisch aktiv ist. Um eine mögliche Dimerisierung experimentell zu untersuchen, wurden jeweils zwei C-terminal unterschiedlich markierte Versionen von YpaA (YpaA-8His/YpaA-HA sowie YpaA-8His/YpaA-BIO) in der biosynthesedefizienten *AribB* Mutante unter der Kontrolle des RFN-Elements co-exprimiert. Die anschließende Affinitätsreinigung über eine Ni-NTA, HA- oder Avidin-Matrix ließ jedoch keine Co-Elution und damit Interaktion der beiden Proteine erkennen. Für den Fall, dass die hoch-affine Bindestelle für Riboflavin von zwei Monomeren gebildet wird, und um eine eventuelle Wechselwirkung durch Bindung des Substrats zu festigen, wurde die Reinigung in Gegenwart von Riboflavin durchgeführt. Aber auch unter diesen Bedingungen war keine Co-Elution zu beobachten. Mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden weder durch  $\beta$ -Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer, noch durch die Temperatur, bei der die Proben denaturiert wurden, aufgehoben, da beide Variablen das Laufverhalten von YpaA im SDS-Gel und Western Blot nicht beeinflussten. Deshalb sprechen diese Ergebnisse dafür, dass YpaA tatsächlich als Monomer den Transport von Riboflavin vermitteln kann. Dies wird auch durch neuere Bindungsstudien gestützt, die eine 1:1-Stöchiometrie der Bindung von Riboflavin an das YpaA-Homologe RibU ergaben, was ebenfalls auf ein Monomer als katalytische Einheit hindeutet (56).

### I.D.1.6.2. YpaA alleine scheint den Transportprozess zu bewerkstelligen

*B. subtilis* verfügt neben YpaA vermutlich über kein weiteres Transportsystem für Riboflavin, da eine *ΔribB ΔypaA* Mutante deutlich mehr Riboflavin für optimales Wachstum benötigte als eine *ΔribB* Mutante und die Deletion von *ypaA* zum Verlust der Aufnahmeaktivität für Riboflavin führte (Abb. 1.9, 1.14 C). Es ist sehr wahrscheinlich auch das einzige Protein, das am Aufnahmeprozess in *B. subtilis* beteiligt ist, da die Überexpression von *ypaA* alleine ausreichte, um die Transportaktivität drastisch ansteigen zu lassen. Wäre ein weiteres Protein daran beteiligt, sollte seine Expression die Aktivität limitieren, außer es würde konstitutiv exprimiert und läge in großen Mengen in der Zelle vor.

Da *ypaA* zwar heterolog in *E. coli* exprimiert werden konnte, dort aber nicht aktiv war, wurde der Frage nachgegangen, ob YpaA für den Transport von Riboflavin eventuell doch auf ein weiteres Protein angewiesen ist. Um dies experimentell zu untersuchen, wurde eine C-terminal 8His-markierte Version von *ypaA* in dem biosynthesedefizienten Stamm *ΔribB::Tc<sup>r</sup>* exprimiert. Nach Solubilisierung der Membranfraktion wurde YpaA-8His über eine Ni-NTA Matrix gereinigt und die Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE analysiert. Neben YpaA waren weitere Proteine und damit mögliche Interaktionspartner in den Eluat zu sehen, die mittels Massenspektroskopie identifiziert wurden. Drei der insgesamt fünf Proteine stellten uncharakterisierte, hypothetische Proteine dar und wurden von benachbarten Genen innerhalb der *hutP-bglP* intergenischen Region kodiert (*yxjC* [P42294], *yxjD* [Transposase-Homologes, P42296] und *yxxD* [P40737]). Bei den anderen beiden handelte es sich um den Transkriptionsregulator LevR (P23914) und das Riboflavinbiosynthesegen RibA (P17620). Die mögliche Interaktion eines Biosynthesegens mit YpaA schien am interessantesten und wahrscheinlichsten und wurde in weiteren Versuchen untersucht. Sie konnte allerdings nicht bestätigt werden. Vermutlich handelte es sich dabei um ein Artefakt, das in der Konstruktion des *ΔribB::Tc<sup>r</sup>* begründet sein könnte. Das Gen *ribB*, das im Riboflavinbiosyntheseoperon vor *ribA* liegt, wurde durch die terminatorlose Tetracyclin-Kassette deletiert. Demnach wäre es möglich, dass eine starke bicistronische Expression des Tetracyclin-Resistenzgens zu einer ebenfalls erhöhten Expression von *ribA* und eventuell zu unspezifischen Wechselwirkungen seines Genprodukts führte.

Die Tatsache, dass *ypaA* in *E. coli* nicht funktionell exprimiert werden konnte, ließe sich auch mit der spezifischen Lipidzusammensetzung der beiden bakteriellen Membranen erklären. Der größte Unterschied besteht bei Phosphatidylethanolamin (PE), das in *E. coli* 75% und in *B. subtilis* nur 25% der Lipide ausmacht (43, 112). Daneben enthält die Membran von *B. subtilis* 15 bis 20% Lysylphosphatidylglycerol und Glykolipide, die in *E. coli* nicht zu finden sind. Es gibt immer mehr Vermutungen und Indizien, die für eine Co-Evolution von Struktur und Funktion der Transportproteine mit der Lipidumgebung sprechen. Erste Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Aktivität eines Membranproteins und der Lipidumgebung lieferten Untersuchungen an der Laktose Permease (LacY). In PE-haltigen Proteoliposomen oder intakten Zellen transportierte sie ihr Substrat durch Protonensymport entgegen des Konzentrationsgradienten. Wurde sie in



Abwesenheit von PE rekonstituiert oder in Zellen mit beeinträchtigter PE-Synthese exprimiert, war sie nur noch zur erleichterten Diffusion fähig (20, 37, 273). Das Fehlen von PE hat zur Folge, dass die Außenseite der Plasmamembran sehr viel weniger positive Ladungen aufweist. Dadurch kann es zu einer fehlerhaften Insertion von Membranproteinen kommen, die meist nach der „positive inside rule“ abläuft (2, 80, 267). Aufgrund der fehlenden Ladungsabstoßung können dann stark positiv geladene Loops irrtümlich extrazellulär lokalisiert sein. Diese Inversion der Topologie wurde für LacY gezeigt, deren TMDs 1-6 in Abwesenheit von PE die entgegengesetzte Orientierung besaßen (21). Eine ähnliche Abhängigkeit wurde auch für andere Proteine, z.B. die Phenylalanin-Permease (PheP) aus *E. coli*, nachgewiesen. Neben der Inversion von Transmembranhelices führte die Abwesenheit von PE zu einer Erhöhung des  $K_m$ -Wertes und einer Erniedrigung der maximalen Transportrate  $V_{max}$  (288). Ein gegenteiliger Effekt wäre denkbar, wenn ein Membranprotein aus *B. subtilis* heterolog in *E. coli* exprimiert wird, wie z.B. YpaA. Sein N-Terminus, der in *B. subtilis* unter der Annahme von 5 TMDs extrazellulär lokalisiert ist, der Loop zwischen TMD3/4 sowie der C-Terminus weisen eine überdurchschnittlich hohe Dichte an positiv geladenen Aminosäuren auf (Abb. 1.8 A). Der rund 3fach höhere Gehalt an PE in der Plasmamembran von *E. coli* könnte somit, nicht alleine wegen der höheren Dichte an positiven Ladungen auf der Außenseite, eine veränderte Membrantopologie, Energieabhängigkeit oder Kinetik zur Folge haben.

## **I.D.2. Die Expression von Hybrid-Flavoproteinen mit nicht-natürlichen Liganden**

Die Substitution der natürlichen Flavine durch chemisch-modifizierte Analoga ist unerlässlich, um die äußerst komplexen Reaktionsmechanismen oder die aktiven Zentren von Flavoproteinen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der co-translationalen Beladung eines Flavoproteins mit dem Riboflavinanalogon Roseoflavin getestet. Dazu wurde das Flavoprotein Dodecin zusammen mit *ribM* in *E. coli* exprimiert. Die hohe Affinität von Dodecin zu Riboflavin führte bei seiner Überexpression vermutlich zu einem starken Riboflavinmangel in den Zellen. Da die Riboflavinbiosynthese in *E. coli* nicht der Regulation durch Flavine unterliegt, sondern konstitutiv erfolgt, kann als Antwort auf die Unterversorgung nicht mehr Riboflavin gebildet werden. Das von außen zugesetzte Roseoflavin wurde aufgrund des steilen Konzentrationsgradienten sehr effizient aufgenommen und in Dodecin eingebaut, womit es dem Transportgleichgewicht entzogen wurde. Der starke Netto-Import blieb solange aufrecht, bis alles Roseoflavin aufgenommen war. Die anschließende Analyse der an Dodecin gebundenen Chromophoren ergab einerseits, dass das Flavinanalogon nicht im Überschuss zugegeben wurde und damit nicht ausreichte, um die insgesamt zwölf Bindungsstellen des Dodecins vollständig zu besetzen. Andererseits war die „Verunreinigung“ mit endogenem Riboflavin, das aus der Biosynthese stammte, mit 4% vernachlässigbar klein. Somit war die Beladung eines Flavoproteins mit nicht-natürlichen Liganden während seiner Expression sehr

erfolgreich. Allerdings unterscheidet sich Dodecin von typischen Flavoproteinen, deren Cofaktoren mithilfe dieser Methode substituiert werden sollen, weshalb die Strategie noch weiter optimiert werden muss. Die meisten Flavoproteine enthalten nicht Riboflavin, sondern meist nur ein oder zwei Moleküle FMN oder FAD als prosthetische Gruppe. Da FMN und FAD kein Substrat von RibM darstellen und *E. coli* nicht in der Lage ist, die beiden Flavine zu freiem Riboflavin abzubauen, können die Analoga nur in der Riboflavin-Form aufgenommen werden. Um die Umwandlung in die jeweiligen phosphorylierten Verbindungen vor ihrem Einbau sicherzustellen, müsste auch die Riboflavinkinase/FAD Synthetase RibF in *E. coli* überexprimiert werden. Die Bindung von nur einem Chromophor pro Molekül Flavoprotein führt selbst bei seiner Überexpression nicht zu einem derart ausgeprägten Riboflavinmangel und Konzentrationsgradienten wie im Fall von Dodecin. Damit stiege die Wahrscheinlichkeit, dass endogenes FMN oder FAD anstelle des Analogons eingebaut wird.

Deshalb wird in Zusammenarbeit mit Dr. Tilo Mathes aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hegemann (Humboldt-Universität zu Berlin) ein optimierter *E. coli* Expressionsstamm hergestellt. In das Genom einer riboflavinauxotrophen *E. coli* Mutante wurde *ribM* unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors integriert. Da die Zellen keine Riboflavinbiosynthese besitzen, muss zunächst allerdings eine niedrigst-mögliche Riboflavinkonzentration ermittelt werden, die gutes Wachstum erlaubt. Ob die Zellen vor der Induktion des Transporters und des gewünschten Flavoproteins an Riboflavin verarmt werden müssen, oder ob eine Überführung in riboflavinfreies Medium mit der Induktion ausreicht, muss ebenfalls untersucht werden. Im Fall von Dodecin war eine vorherige Verarmung jedenfalls nicht notwendig. Aufgrund der Auxotrophie für Riboflavin sollte anschließend nur das von außen zugegebene Flavin in das Flavoprotein eingebaut werden.

Auch wenn es noch einiger Optimierung bedarf, ist mit der Charakterisierung des Transportmechanismus und der Substratspezifität von RibM das Ziel der *in vivo* Herstellung von Hybrid-Flavoproteinen in *E. coli* sehr viel näher gerückt.

## II. Kapitel

---

Die Charakterisierung des Thiamintransporters  
Thi9 aus *Schizosaccharomyces pombe*

---

## II.A. Einleitung

### II.A.1. Von Beriberi zu Thiamin

*"A certain very troublesome affliction, which attacks men, is called by the inhabitants Beriberi (which means sheep). I believe those, whom this same disease attacks, with their knees shaking and legs raised up, walk like sheep. It is a kind of paralysis, or rather tremor: for it penetrates the motion and sensation of the hands and feet indeed sometimes the whole body..." (Jacobus Bonitus, 1630).*

Mit diesen Worten beschrieb der niederländische Arzt Dr. Jacobus Bonitus zum ersten Mal die Krankheit Beriberi und ihre Symptome, die er auf der Insel Java bei Einheimischen beobachtet hatte. Das Wissen um die Erkrankung reicht zurück bis in die Antike und wurde bereits 2700 v. Chr. in chinesischen Aufzeichnungen erwähnt (281). Sie war die erste Stoffwechselstörung, die als „Mangelerscheinung“ bezeichnet wurde. Besonders stark trat die Krankheit unter japanischen Seeleuten auf, deren Ernährung während der monatelangen Reisen hauptsächlich aus weißem, geschälten Reis bestand. Sie betraf das Nervensystem (Polyneuritis, Muskelschwäche, Krämpfe) sowie das Herzkreislaufsystem (Herzhypertrophie, Atemnot, Ödeme). Äußerlich macht sich das am typischen Gang der Erkrankten bemerkbar, der an den eines Schafs erinnerte. Durch Zufall erkannte der holländische Kolonialarzt Christiaan Eijkman im Jahre 1890 – ebenfalls auf Java –, dass Hühner dieselben typischen Anzeichen (wie z.B. Lähmungserscheinungen) entwickelten, wenn sie weißen Reis zu fressen bekamen. Wurden sie anschließend mit ungeschältem Reis gefüttert, verschwanden die Symptome. Diese Beobachtungen sprachen gegen die damals vertretene Ansteckungstheorie, wonach die Krankheit durch Mikroben verbreitet würde. Sie unterstützten vielmehr die Meinung, dass die Krankheit mit der Ernährung und der Nahrungszubereitung zusammenhängen müsse. Der polnische Biochemiker Casimir Funk hörte von diesen neuen Erkenntnissen und versuchte 1911, die verantwortliche Substanz aus der Schale von Reiskörnern zu isolieren. Allerdings musste er feststellen, dass seine Verbindung nicht der gesuchte „Anti-Beriberi-Faktor“ war. Dieser wurde im Jahr 1926 von Barend Coenraad Petrus Jansen und W. Donath isoliert und kristallisiert, die ihn auch als „Aneurin“ (**Anti-neuretisches Vitamin**) bezeichneten (101).

Roger J. Williams erkannte 1930, dass nicht nur das Wachstum von Tieren, sondern auch das mancher Hefearten durch Donaths Kristalle stimuliert wurde. Da er damit die erste Nachweismethode von Vitaminen etablierte, die auf dem Wachstum von Mikroorganismen beruht, gilt er als Begründer der modernen Vitaminforschung. Er vereinte damals die zwei Forschungsrichtungen, die einerseits an der Identifizierung von Vitaminen mithilfe von Tierversuchen und andererseits an der Erforschung der Wachstumsfaktoren durch Methoden der Mikrobiologie arbeiteten (280). Da Aneurin das erste wasserlösliche Vitamin der B-Gruppe war, wurde es bei der Klassifizierung der Vitamine als Vitamin B<sub>1</sub> bezeichnet. Seine Struktur wurde 1936 von R. R. Williams aufgeklärt, dem auch die chemische

Synthese gelang. Der enthaltene Schwefel und die Aminogruppe verliehen dem Vitamin den heute geläufigsten Namen: Thiamin. Für ihre herausragenden Verdienste um die Erforschung der Vitamine und speziell von Vitamin B<sub>1</sub> wurden Christiaan Eijkman und Sir Frederick G. Hopkins 1929 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Bis heute ist es aber noch nicht gelungen, die industrielle chemische Synthese durch einen biotechnologischen Prozess mit Thiamin-überproduzierenden Mikroorganismen zu ersetzen, wie es für andere Nahrungszusätze und Vitamine bereits geschehen ist (28, 239).

## II.A.2. Die Struktur und Chemie von Thiamin und Pyriithiamin

Das wasserlösliche Thiamin (Abb. 2.1) besteht aus den beiden Heterozyklen 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin (= Hydroxymethylpyrimidin, HMP) und 5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol (= Thiazol, HET), die durch eine Methylenbrücke miteinander verknüpft sind. Die Hydroxyethyl-Seitenkette des Thiazols kann durch ATP-Aufwand ein-, zwei- oder dreifach phosphoryliert werden, wodurch Thiaminmonophosphat (TMP), -diphosphat (TDP) oder -triphosphat (TTP) entsteht.

Für die Funktion des Thiamins in seiner Cofaktor-Form ist die „N=CH-S“-Gruppe im Thiazol entscheidend. Die C-H Bindung darin ist durch das positiv geladene Stickstoffatom und den elektronegativeren Schwefel polarisiert und sehr azid, da auch das entstehende Carbanion sehr gut mesomeriestabilisiert ist. Die typische Reaktion dieses Anions ist eine nucleophile Addition an positiv teilgeladene Kohlenstoffatome in Carbonlygruppen.

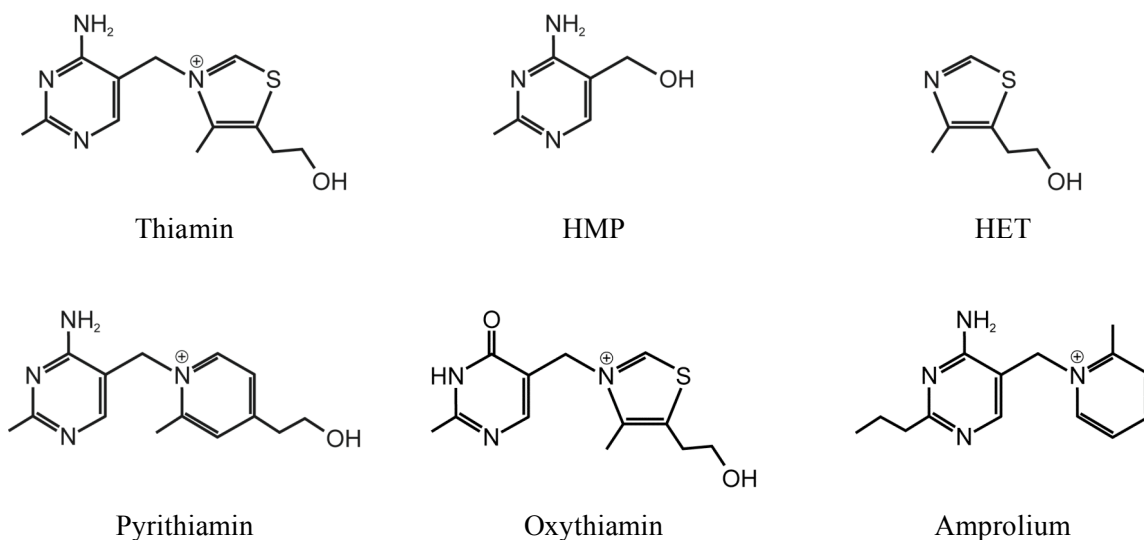


Abb. 2.1. Die Strukturformeln von Thiamin, seiner Vorstufen HMP und HET sowie der Analoga Pyriithiamin, Oxythiamin und Amprolium.

Pyrithiamin ist ein chemisch synthetisiertes Derivat von Thiamin, in dem der Thiazolring gegen einen Pyridinring ausgetauscht ist. Das Enzym Pyrophosphokinase, das Thiamin zu TDP phosphoryliert, kann zwar Pyrithiamin trotz des strukturellen Unterschieds binden, wird aber dadurch inaktiviert, worin der toxische Effekt dieses Analogons besteht (Abb. 2.1, (142)).

### II.A.3. Die Funktion von Thiamin im Stoffwechsel

Die Funktionen von Thiamin im Stoffwechsel wurden ab 1920 durch die herausragenden Arbeiten von R. Peters entschlüsselt (200). Es war das erste Vitamin, für das eine entscheidende Bedeutung im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel nachgewiesen wurde. In der Form des Thiamindiphosphats ist es der essentielle Cofaktor von vier Enzymfamilien:

Die drei Multienzymkomplexe *Pyruvat-Dehydrogenase*,  *$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase* und der *Verzweigketten- $\alpha$ -Keto-Dehydrogenase-Komplex* sind in den Mitochondrien an der oxidativen Decarboxylierung von 2-Oxosäuren beteiligt. Die dabei um ein C-Atom verkürzten Verbindungen werden durch Coenzym A aktiviert und erhalten dadurch eine energiereiche Thioesterbindung. Neben der katalytischen Funktion kann TDP durch allosterische Bindung an eine regulatorische Stelle der Pyruvat-Dehydrogenase den  $K_m$ -Wert für Pyruvat erniedrigen (47).

Die *Acetolactat-Synthase* ist an der in Mitochondrien ablaufenden Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Valin und Isoleucin beteiligt. Dabei wird Pyruvat unter nicht-oxidativer Decarboxylierung an ein weiteres Pyruvatmolekül oder an 2-Ketobutyrat gekoppelt, wodurch die Zwischenprodukte 2-Acetolactat oder 2-Aceto-2-hydroxybutyrat entstehen.

*Transketolasen* übertragen  $C_2$ -Einheiten von Ketosen auf Aldosen. Diese Reaktion findet im Cytoplasma statt und ist Bestandteil des Pentosephosphatwegs, der dazu dient, NADPH sowie Ribose für die Nukleotidbiosynthese herzustellen.

Die im Cytoplasma lokalisierte *Pyruvatdecarboxylase* katalysiert die Hauptreaktion der alkoholischen Gärung in Hefen: die Spaltung von Pyruvat zu Acetaldehyd und Kohlendioxid.

Nimmt der Mensch nicht genügend Thiamin mit der Nahrung auf, hat der dadurch ausgelöste Mangel schwerwiegende Auswirkungen auf den Stoffwechsel. Die thiaminabhängigen Enzyme im Pentosephosphatweg oder auch im Zitronensäurezyklus verlieren ihre Aktivität, was sowohl zu einer Erniedrigung der NADPH-Konzentration als auch zum Anstieg der Konzentration von Glykolysezwischenprodukten führt (254). Beides fördert die Entstehung von (Methyl-)Glyoxal, einem reaktiven  $\alpha$ -Oxoaldehyd, das mit Aminogruppen von Proteinen reagieren und nach diversen nicht-enzymatischen Reaktionen und Umlagerungen „Advanced Glycation Products“ (AGEs) bilden kann. Diese werden mit einer Reihe von physiologischen aber auch pathologischen Vorgängen wie z.B. Alterungsprozessen in Verbindung gebracht.

Thiamin ist auch in der Form des Thiamintriphosphats (TTP) ubiquitär in allen Organismen – von den Bakterien bis zu den Säugetieren – zu finden und besitzt deshalb sehr wahrscheinlich eine wichtige, größtenteils aber noch ungeklärte Funktion im Stoffwechsel und in der Signalweiterleitung. Es wird in niedriger Konzentration durch Phosphorylierung von TDP gebildet und unterliegt dabei einer sehr präzisen Regulation, indem es durch das Enzym Thiamintriphosphatase auch wieder abgebaut werden kann. Die erste physiologische Funktion von TTP konnte in Bakterien gezeigt werden. Wurden sie von Vollmedium auf Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle überführt, löste der Nährstoffmangel eine Stressreaktion und die Synthese von TTP aus, die durch die Zugabe von Aminosäuren verhindert werden konnte (133). In ihren Arbeiten zeigten Bettendorff et al., dass in Abwesenheit einer verwertbaren Kohlenstoffquelle – wie Glucose – nicht TTP, sondern ein neuartiges Thiaminderivat, das Adenosin-Thiamintriphosphat, gebildet wird (16, 17, 151). Es wurde auch in niedrigeren Konzentrationen in Hefen, Wurzeln höherer Pflanzen und in tierischem Gewebe gefunden und ist neben Coenzym A, FAD und  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  ein weiteres Beispiel für einen Adennukleotid, dessen katalytischer Teil von einem Vitamin gebildet wird. In Säugern wird TTP im Nervengewebe und in den Skelettmuskeln gebildet. Während es im Nervengewebe hauptsächlich membrangebunden vorliegt, ist es im Muskel größtenteils im Cytoplasma zu finden. Seine genaue Funktion ist noch unklar, besteht aber in Nervenzellen sehr wahrscheinlich in der Phosphatübertragung auf Membranproteine. So konnte eine Aktivierung von Chloridkanälen durch Phosphorylierung nachgewiesen werden (184).

## **II.A.4. Der Stoffwechsel von Thiamin**

### **II.A.4.1. Die Thiaminbiosynthese**

Die meisten Bakterien, Pilze und Pflanzen sind in der Lage, Thiamin *de novo* zu synthetisieren. Obwohl dies besonders eingehend für die Bakterien *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* (135, 138, 196) sowie für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht wurde (191), sind manche Schritte der Biosynthese immer noch ungeklärt. Im Folgenden sollen die Erkenntnisse der Thiaminbiosynthesewege in *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (die auch in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt sind) sowie *A. thaliana* vor dem Hintergrund der bakteriellen Biosynthese beleuchtet werden.

Obwohl die Thiaminbiosynthese in verschiedenen Domänen des Lebens nach unterschiedlichen Mechanismen abläuft, ist das Grundprinzip hochkonserviert. Die beiden Vorsufen HMP-Phosphat (HMP-P) und HET-Phosphat (HET-P) werden in allen Organismen durch zwei unabhängige Synthesewege hergestellt und anschließend zu Thiaminmonophosphat (TMP) verknüpft (13, 237).

### II.A.4.1.1. Die Biosynthese der Pyrimidineinheit

In Bakterien ist die Bildung von HMP-P noch größtenteils unverstanden und *thiC* ist das einzige Gen, das bislang in diesem Zusammenhang identifiziert wurde (262, 289). Durch die Aktivität seines Genprodukts und eines zusätzlichen, noch nicht identifizierten Proteins wird 5-Aminoimidazolribonukleotid (AIR), ein Zwischenprodukt in der Purinbiosynthese, in HMP-P umgewandelt (135).

Im Gegensatz dazu wird in der Hefe *S. cerevisiae* die Pyrimidinstruktur des HMP-P aus Pyridoxal-5-Phosphat (PLP, der aktive Cofaktor des Vitamin B<sub>6</sub>) und Histidin aufgebaut. Die Enzyme, die an der Bildung von Pyridoxin beteiligt sind, gehören zur Familie der *SNZ*- und *SNO*-Gene (215). Das Genom der Bäckerhefe enthält jeweils drei Kopien beider Gene, von denen *SNZ2/SNZ3* und *SNO2/SNO3* zu 99%, also damit nahezu vollständig identisch zueinander sind, und deren Genexpression der Kontrolle durch Thiamin unterliegt. Die Kopien *SNZ1* und *SNO1* weisen mit 81% Identität höhere Divergenz zu ihren Gegenstücken auf und sind nicht durch Thiamin reguliert. Homologe der *SNZ* bzw. *SNO* Gene lassen sich in vielen weiteren bakteriellen, archeellen, pilzlichen und pflanzlichen Vertretern finden (65, 177). In *B. subtilis* sind zwei Proteine an der Pyridoxinbiosynthese beteiligt: Pdx1, das rund 60% Identität zu den Proteinen Snz1/2/3 aufweist, und Pdx2, das zu rund 30% mit Sno1/2/3 identisch ist. Durch nähere Charakterisierung und Aufklärung der Kristallstruktur der bakteriellen Orthologen konnte damit auch den Snz und Sno Proteinen eine Funktion und die mögliche katalytische Aktivität zugeschrieben werden. Pdx1, dessen Tertiärstruktur ein ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel darstellt, bildet als Dodecamer mit 12 Pdx2 Untereinheiten einen PLP-Synthase Komplex in Form eines Zahnrads, der die Aktivität einer Glutamin-Amidotransferase besitzt (246). Pdx2 ist dabei die Glutaminase, die durch Hydrolyse von Glutamin ein Ammoniumion freisetzt. Dieses wird durch einen Methionin-reichen, hydrophoben Tunnel zur Synthase (Pdx1) geleitet, die in einer einzigen, bemerkenswerten Reaktion aus einer Pentose (Ribose-5-Phosphat bzw. Ribulose-5-Phosphat), einer Triose (Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. Dihydroxyacetonphosphat) und dem Ammonium PLP synthetisieren kann (31, 209).

In höheren Eukaryoten wurde bislang ebenfalls nur jeweils ein einziges Gen identifiziert, das eine Rolle in der nachfolgenden HMP-Synthese spielt: *THI5* aus *S. cerevisiae*, *nmt1*<sup>+</sup> aus *S. pombe* und *THIC* aus *Arabidopsis thaliana*.

*THI5* gehört zusammen mit *THI11*, *THI12* und *THI13* zu einer Genfamilie, die unter Thiaminmangel zu den am stärksten induzierten Genen zählen und deren Genprodukte in ihrer Funktion redundant sind (181, 278). Nur eine Deletion aller vier Gene führt unter aeroben Bedingungen zur Thiaminauxotrophie, die durch die Gabe von HMP geheilt werden kann (278). Die Aufgabe von Thi5 oder eines Homologen besteht also darin, die Grundstruktur des Pyridoxins – den Pyridinring – durch den Einbau eines weiteren Stickstoffatoms, das dem Histidin entstammt, in einen Pyrimidinring umzuwandeln. Die Wechselwirkung von Snz2 mit Thi11 in einen Yeast-Two-Hybrid



Assay ließ eine mögliche Interaktion der Sno/Snz Proteine und einem Mitglied der Thi5-Familie postulieren (215). Obwohl die *THI5*-Genfamilie die einzige ist, die bislang für die Herstellung von HMP-P identifiziert wurde, lässt sich nicht ausschließen, dass weitere Genprodukte daran beteiligt sein können. *S. cerevisiae* besitzt darüber hinaus einen ineffizienteren Weg zur HMP-Synthese, der nicht über Pyridoxin als Zwischenprodukt abläuft. Dieser Weg ist unabhängig von den Thi5-Isozymen und kommt hauptsächlich unter anaeroben Wachstumsbedingungen zum Tragen (252, 278).

Die Beteiligung einer Genfamilie mit vier Mitgliedern an einem einzigen Schritt der Thiaminbiosynthese ist beschränkt auf den Zweig der HMP-Biosynthese und innerhalb der Hefen eine Besonderheit der Gattung *Saccharomyces*. Die *THI20*-Genfamilie ist ein weiteres Beispiel dafür, genauso wie die Familien der *SNZ2/3*- und *SNO2/3*-Gene, die benachbart zu *THI5* bzw. *THI12* in den subtelomeren Bereichen zweier Chromosomen liegen und aufgrund ihrer sehr hohen Homologie aller Wahrscheinlichkeit nach durch Duplikation entstanden sind (215, 278). Wieso liegen gerade Gene, die Enzyme des HMP-Biosyntheseweges kodieren, in mehreren Kopien vor? Pyridoxalphosphat übernimmt in der Zelle nicht nur die Rolle der HMP-Vorstufe, sondern wird auch als wichtiger Enzym-Cofaktor und zur Eliminierung freier Radikale benötigt. Da die Expression von *SNZ2/SNO2* und *SNZ3/SNO3* durch Thiamin reguliert wird, ist bei Thiaminmangel die ausreichende Produktion von PLP sichergestellt. Die vier Thi5-Isozyme sorgen anschließend für seine effiziente Umwandlung in HMP.

*S. pombe* besitzt mit Nmt1 (= Thi2) ein sehr homologes Protein, das zu 60% mit Thi5 identisch ist. Sein Gen wurde in einem Screen identifiziert, in dem die Induktion von Genen bei Thiaminmangel untersucht wurde. Es war das erste Gen, für das eine vollständige Repression in Anwesenheit von Thiamin gezeigt werden konnte („no message in thiamine“). Die Thiaminauxotrophie von *nmt1* Mutanten konnte durch die Gabe von HMP komplementiert werden, was auf eine Beteiligung an der Synthese der Pyrimidineinheit schließen ließ (225). Aufgrund der starken Homologie zwischen Nmt1 und Thi5 wäre denkbar, dass die HMP-Synthese in *S. pombe* analog zu der in *S. cerevisiae* abläuft.

Im Gegensatz dazu besitzt THIC aus *A. thaliana* mit 53% Identität eine sehr große Ähnlichkeit mit seinem bakteriellen Ortholog ThiC und nicht mit den Proteinen Thi5 oder Nmt1 aus Hefe. Das lässt vermuten, dass die HMP-Biosynthese in Pflanzen wie in Bakterien von AIR ausgeht. Analog der Biosynthesegene in den anderen Organismen, unterliegt *THIC* der negativen Regulation durch Thiamin (208).

#### **II.A.4.1.2. Die Biosynthese der Thiazoleinheit**

In Bakterien wird HET-P in einem komplexen Syntheseweg, der mehrere Schritte umfasst, hergestellt. Als Vorstufen dienen Tyrosin (in fakultativen Anaerobiern wie *E. coli* oder *Salmonella typhimurium*) bzw. Glycin (in Aerobiern wie *B. subtilis*), Cystein, Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat. Die 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat (DXP) Synthase verknüpft GAP und Pyruvat zu DXP, das den

Hauptteil des Thiazol-Grundgerüsts bildet. Das aus 66 Aminosäuren bestehende Protein ThiS übernimmt die Rolle des Schwefel-Akzeptors, die Aminosäure Cystein die Rolle des Donors. Mithilfe der Enzyme ThiF, IscS und ThiI (*E. coli*) bzw. ThiF und NifS (*B. subtilis*) wird elementarer Schwefel auf den aktivierten C-Terminus von ThiS übertragen, wodurch ein Thiocarboxylat entsteht. Die Vorstufen Tyrosin bzw. Glycin werden in *E. coli* durch ThiH, ein Fe-S Cluster tragendes Protein, bzw. in *B. subtilis* durch das FAD-abhängige Enzym ThiO in Glyoxylat umgewandelt. Der letzte Schritt, die Kondensation von DXP, Glyoxylat und Schwefel, wird von ThiG übernommen (229) und darin enthaltene Referenzen).

Archeen und die meisten Eukaryoten besitzen jedoch keine Homologen zu den bakteriellen Enzymen, was dafür spricht, dass HET-P in diesen Organismen auf einem grundsätzlich unterschiedlichen Weg hergestellt wird. In höheren Eukaryoten konnte bislang nur jeweils ein Gen, nämlich *THI4* in *S. cerevisiae*, *nmt2<sup>+</sup>* (= *thi3<sup>+</sup>*) in *S. pombe* und *THI1* in *A. thaliana*, identifiziert werden, deren Genprodukte zu 40% bzw. 50% zu einander identisch und an der Synthese der Thiazoleinheit beteiligt sind (147, 153, 201). Im Gegensatz zu den Genfamilien, deren Produkte die HMP-P Synthese katalysieren, liegt *THI4* nur in einfacher Kopie im Genom von *S. cerevisiae* vor und seine Expression wird, ebenso wie die der Gene, *nmt2<sup>+</sup>* und *THI1*, durch die Anwesenheit von Thiamin gesteuert. Unter Thiaminmangel ist Thi4 eines der am meistvorhandenen Proteine (181).

Die Aufklärung der homooktameren Struktur von Thi4 lieferte Hinweise auf die mögliche Vorstufe des Thiazols in Hefen sowie einen möglichen Reaktionsmechanismus (36). Während des Kristallisationsvorgangs war die Verbindung Adenosin-diphospho-5-( $\beta$ -ethyl)-4-methylthiazol-2-carboxysäure (ADT) stark an eine konservierte Bindestelle des Enzyms assoziiert, die sehr homolog zur FAD-Bindedomäne des ThiO Proteins ist (106). Aus diesem Grund könnte es sich dabei um ein Intermediat der HET-Biosynthese handeln. Seine wahrscheinlichste Vorstufe stellt der Redoxfaktor NADH dar, der theoretisch mit Glycin in einer Reihe von Reaktionen zu ADT umgewandelt werden könnte (36). Im Gegensatz zu Bakterien scheint Thi4 alleine die HET-P Synthese katalysieren zu können. In welcher Form und von welchem Protein der Schwefel bereitgestellt wird, ist allerdings noch unklar. Das ist auch der Grund, weshalb der Mechanismus bislang nur bis zur Stufe des Schwefeleinbaus nachvollzogen werden konnte. Erst wenn der Schwefeldonor bekannt ist, kann die weitere HET-P Synthese durch Thi4 in *in vitro* Studien getestet werden.

Neben der Aufgabe bei der Thiaminbiosynthese besitzen Thi4 aus *S. cerevisiae* und seine pflanzlichen Homologen eine weitere, essentielle Funktion. *THI1* aus *A. thaliana* wurde ursprünglich als Multicopy-Suppressor identifiziert, der teilweise in der Lage war, *E. coli* Mutanten mit defektem DNA Reparaturmechanismus (Basen-/Nukleotidaustausch) zu komplementieren (147). Da sein Genprodukt hohe Ähnlichkeit zu Thi4 aus *S. cerevisiae* zeigte und eine thiaminauxotrophe *thi4Δ* Mutante komplementieren konnte, wurde vermutet, dass auch Thi4 eine wichtige Rolle bei der Toleranz und Reparatur von DNA-Schäden übernimmt. Das gehäufte Auftreten von petite *thi4* Mutanten mit respiratorischen Defekten konnte auf eine Schädigung der mitochondrialen DNA

zurückgeführt werden (148). Der schützende Effekt von Thi4 liegt dabei nicht in der Thiaminbiosynthese begründet, sondern im Protein selbst. Die pflanzlichen Homologen besitzen ein N-terminales Signalpeptid für Chloroplasten, wo vermutlich auch die Thiazolbiosynthese abläuft (14, 105). In *S. cerevisiae* gibt es widersprüchliche Hinweise, was die Lokalisation von Thi4 betrifft. Zum einen sprechen Tatsachen dafür, dass Thi4 in *S. cerevisiae* mitochondriell lokalisiert ist und demnach dort auch die Thiazolbiosynthese abläuft, da Thi4 eine N-terminale Region besitzt, die ein putatives mitochondrielles Signalpeptid darstellt. Zudem war Thi1 aus *A. thaliana* nur dann in der Lage, eine *thi4Δ* Mutante zu komplementieren, wenn es sein eigenes oder ein mitochondrielles Signalpeptid aus Hefe trug (211). Andererseits war ein funktionelles Thi4-GFP Fusionprotein hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert, was den Ort der Thiazolbiosynthese offen lässt, jedoch eine zusätzliche Lokalisation von Thi4 in Mitochondrien nicht ausschließt (265). Der genaue Ort der HET-Biosynthese bleibt somit weiter offen. Während *THI4* in Abwesenheit von Thiamin zu den am stärksten induzierten Genen gehört, wird es in dessen Anwesenheit nicht vollständig reprimiert, was den Schutz der mitochondriellen DNA sicherstellt (148).

### II.A.4.1.3. Die Bildung von Thiamindiphosphat

Die Verknüpfung zum Thiaminmonophosphat kann nur mit den phosphorylierten Formen HMP-Pyrophosphat (HMP-PP) und HET-P erfolgen.

In Bakterien übernimmt die HMP Kinase ThiD die zweifache Phosphorylierung des HMP, in *S. cerevisiae* tun dies die Proteine Thi20 und Thi21. Sie sind zwei äußerst ähnliche, in ihrer Funktion redundante Genprodukte der thiaminregulierten *THI20*-Genfamilie (*THI20/THI21/THI22*) und damit ein weiteres Beispiel für multiple Kopien eines HMP-Biosyntheseogens (144). Das dritte Mitglied, *THI22*, ist nicht in der Lage, einen *thi20Δ thi21Δ* Doppelknockout zu komplementieren. Sowohl die Aktivität der HMP Kinase als auch die der HMP-P Kinase liegen im N-Terminus des Proteins, der hohe Homologie zum bakteriellen Ortholog ThiD aufweist (39). Es wird vermutet, dass HMP-P das eigentliche Produkt der Biosynthese ist und die HMP-Kinase Aktivität nur benötigt wird, um intrazellulär frei vorliegendes oder von außen aufgenommenes HMP zu recyceln. Der C-Terminus der Thi20 Proteine besitzt Ähnlichkeit mit TenA, einer bakteriellen Thiaminase II. Bislang sah man die Funktion einer Thiaminase II darin, Thiamin zu den Vorstufen HMP und HET zu hydrolysieren. Die genaue Bedeutung dieser Abbauaktivität im Thiaminstoffwechsel blieb aber im Unklaren. Durch die aktuellen Arbeiten von Jenkins et al. (102) wurde ihr im bakteriellen Thiaminstoffwechsel eine neue Rolle zugesprochen. Wird Thiamin freigesetzt, findet eine basenkatalysierte Spaltung der HET-Einheit statt. Ein mögliches Produkt ist Formylaminopyrimidin, das von den Zellen wieder aufgenommen und über Aminopyrimidin zu HMP umgewandelt werden kann (Abb. 2.3). Der letzte Schritt zu HMP wird von der Thiaminase II katalysiert, die damit eine Salvage-Funktion besitzt. In der Tat verfügt sie über eine sehr viel höhere Affinität zu Aminopyrimidin als zu Thiamin (102). Die Thi20 Familie könnte

somit auch dazu dienen, das externe Spaltprodukt von Thiamin, Aminopyrimidin, nach seiner Aufnahme in HMP-PP umzuwandeln und der Thiaminbiosynthese zur Verfügung zu stellen.

HET wird ebenfalls in seiner phosphorylierten Form HET-P synthetisiert. Die HET-Kinase, die in *E. coli* von *thiK* und in *S. cerevisiae* von *THI6* kodiert wird, dient ebenfalls nur zur Phosphorylierung von freiem, aufgenommenem HET (194). Neben der Kinase-Aktivität, die im C-terminalen Bereich von Thi6 liegt, besitzt das Enzym eine weitere Aufgabe. Die N-terminale Domäne stellt den eigentlichen und wichtigeren Teil dar: die Thiaminphosphat-Synthase. Sie verknüpft HMP-PP und HET-P zu Thiaminmonophosphat. Im letzten Schritt der Biosynthese wird TMP zu freiem Thiamin hydrolysiert und anschließend zu TDP pyrophosphoryliert. Während die Hydrolyse vermutlich durch unspezifische cytosolische Phosphatasen geschieht, wird die nachfolgende Reaktion durch die Thiamin-Pyrophosphokinase katalysiert, die von dem Gen *THI80* kodiert wird. Sowohl *THI6* als auch *THI80* liegen in jeweils einer Kopie im Genom vor und ihre Deletion führt zu Thiaminauxotrophie (113, 192). In Bakterien hingegen wird das synthetisierte Thiaminphosphat direkt durch die Thiaminphosphatkinase zu TDP phosphoryliert.

In *S. pombe* wurde durch Mutagenese das Gen *thi4*<sup>+</sup> identifiziert, das für die Thiamin-Prototrophie entscheidend ist und dessen Expression durch Thiamin kontrolliert wird. Nachdem der Wachstumsdefekt eines *thi4Δ* Knockouts weder durch die Gabe von HMP noch HET geheilt werden kann, katalysiert es vermutlich einen späteren Schritt der Biosynthese. Seine enzymatische Funktion scheint in der Phosphorylierung von HMP oder HET und/oder der Verknüpfung der beiden phosphorylierten Zwischenprodukte zu liegen (296).

Auch die Bildung von Thiaminmonophosphat wird in Pflanzen von einem Enzym katalysiert, das signifikante Ähnlichkeit zu bakteriellen Proteinen besitzt. Neueste Untersuchungen identifizierten THI3 aus *Zea mays*, welches eine N-terminale HMP(-P)-Kinase- und eine C-terminale TMP-Synthase-Aktivität enthält. Obwohl in Bakterien an diesen beiden Schritten zwei Enzyme beteiligt sind, weisen beide Termini rund 39% Sequenzidentität mit den bakteriellen Orthologen auf (206).



## II.A.4.2. Der Transport von Thiamin

Um eine ausreichende Versorgung mit Thiamin sicherzustellen, sind thiaminauxotrophe Organismen auf die Aufnahme des Vitamins angewiesen. Aber nicht nur sie besitzen ein Transportsystem für Thiamin. Auch die meisten Organismen, die über seine *de novo* Biosynthese verfügen, sind in der Lage, Thiamin aus dem Medium zu akkumulieren. So wurde bereits 1937 festgestellt, dass Thiamin – genauer seine Thiazoleinheit – ein essentieller Wachstumsfaktor für isolierte Wurzeln der Tomatenpflanze ist. Pyrimidine besaßen keinen derartigen stimulierenden Effekt (22, 213, 277). Das lässt zu einem darauf schließen, dass Wurzelzellen über ein Aufnahmesystem für Thiamin und Thiazol besitzen, zum anderen nicht zur Biosynthese der HET-Einheit fähig sind.

Mitte der 50er Jahre veröffentlichte Suzuoki-Ziro, dass auch Hefezellen zur Aufnahme von Thiamin fähig sind. Die Transportprozesse, die seitdem eingehend studiert wurden, werden sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* durch die Anwesenheit von Glukose stimuliert und durch Stoffwechselgifte wie Fluorid, Iodoacetat, Azid oder Arsenat inhibiert (225, 250). Diese Energieabhängigkeit sprach dafür, dass ein intakter Stoffwechsel für die Thiaminaufnahme notwendig ist. Die Aufnahmeaktivität, die in beiden Hefen durch Erhöhung der extrazellulären Thiaminkonzentration reprimiert werden konnte (98, 257), erfolgte entgegen dem Konzentrationsgradienten und führte in *S. pombe* zu einer 10fach bis 1000fachen Akkumulation (95, 225). Dabei lag das Thiamin in beiden Hefen hauptsächlich in seiner freien, unphosphorylierten Form vor und nur ein kleiner Teil als Thiamindiphosphat. Thiaminmonophosphat war nicht nachweisbar. Daraus wurde gefolgert, dass eine Phosphorylierung und damit das Enzym Thiaminpyrophosphokinase nicht am Transport beteiligt ist (95).

Der Transportprozess in *S. cerevisiae* zeigte eine typische Michaelis-Menten-Kinetik mit einem  $K_m$ -Wert von 0,18  $\mu\text{M}$  und konnte durch Analoga wie Pyrithiamin sowie durch basische Farbstoffe, z.B. Methylenblau, Triphenyltetrazoliumchlorid, inhibiert werden (96, 99). Damit erfüllte er alle Eigenschaften eines Carrier-vermittelten aktiven Prozesses.

Iwashima et al. (93, 94) gelang es, sowohl ein Membranprotein als auch ein Thiamin-Bindeprotein aus Bäckerhefezellen zu isolieren, die beide durch extrazelluläres Thiamin reprimiert wurden. Versuche mit Hefeprotoplasten, denen dieses Bindeprotein fehlte, ergaben, dass diese genauso gut Thiamin akkumulierten wie intakte Hefezellen (93, 94). Sie waren jedoch nicht mehr in der Lage, Thiaminphosphate aufzunehmen (189). Das Bindeprotein wurde anschließend von Nosaka et al. (190, 193) als Pho3, die thiaminreprimierbare saure Phosphatase, identifiziert. Da Thiamin in seinen phosphorylierten Formen am häufigsten in der Natur vorkommt, besteht die Funktion der Phosphatase darin, die Phosphoester zum freien Thiamin zu hydrolysieren, das dann von den Zellen aufgenommen werden kann. *S. pombe* besitzt dazu die extrazelluläre saure Phosphatase Pho4, deren Genexpression ebenfalls durch Thiamin reguliert wird (225, 228). Pho4 ist ein

extrazelluläres Glykoprotein, das mit 29% Identität nur schwach homolog zu Pho3 aus *S. cerevisiae* ist (286).

Um das Gen, welches den Thiamintransporter kodiert, zu identifizieren, bediente man sich so genannter *ptr* (*pyrithiaminresistenter*) Mutanten. Sie waren in der Lage, auch in Gegenwart des toxischen Thiaminanalogs Pyrithiamin zu wachsen. Da es die Aufnahme von Thiamin kompetitiv inhibieren konnte, musste es durch denselben Mechanismus in die Zelle gelangen wie Thiamin. Deshalb wurde die Resistenz gegenüber Pyrithiamin als Selektionskriterium verwendet, um Mutanten zu isolieren, deren Thiamintransport beeinträchtigt oder defekt war (99, 225). Durch Komplementation dieser Mutanten wurde der Thiamintransporter Thi7 aus *S. cerevisiae* zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen identifiziert (59, 232). *THI7* (Synonym *THI10*, YLR237W) kodiert für ein Plasmamembranprotein und weist hohe Homologie zu den Transportern für Allantoin (Dal4) und Uracil (Fur4) auf. Es gehört damit zur FUR Superfamilie, welche die Aufnahme von Purinen und Pyrimidinen katalysiert (59). Das Genom von *S. cerevisiae* enthält außerdem zwei offene Leserahmen, *THI71* (YOR071C) und *THI72* (YOR192C), die mit 84% bzw. 87% Identität sehr homolog zu Thi7 sind und ebenfalls für Plasmamembranproteine kodieren. Kürzlich wurde YOR071C als Transporter für Nicotinamidribosid (Nrt1) identifiziert (15). Im überexprimierten Zustand sind beide in der Lage, eine *thi7Δ* Mutante zu komplementieren (59, 178, 265). Ob sie neben der Thiaminaufnahme eine weitere Funktion besitzen, ist allerdings immer noch unklar. Während *THI71* (*NRT1*) nicht von Thiamin reguliert wird, unterliegt die Expression von *THI7* und *THI72* der Kontrolle durch Thiamin (178, 195).

Da in *S. cerevisiae* Defekte in der Thiaminbiosynthese durch die Gabe von HMP oder HET komplementiert werden können, muss die Hefezelle ebenfalls über Aufnahmemechanismen für diese beiden Vorläufermoleküle verfügen. Während HET über Diffusion in die Zellen gelangt und durch anschließende Phosphorylierung dort verbleibt, wird HMP durch das Transportsystem für Thiamin aufgenommen (91, 92, 97). Es ist jedoch noch ungeklärt, ob HMP dabei von Thi7 transportiert wird oder von seinen Homologen Nrt1 oder Thi72. In genomweiten Transkriptionsanalysen wurde mit YLR004c ein weiteres Gen gefunden, dessen Expression durch Thiamin reguliert wird. Es kodiert für ein potentiell Membranprotein und gehört zur Dal5 Subfamilie innerhalb der „Major Facilitator Superfamily“, könnte also deshalb ebenfalls an der Aufnahme von Thiaminvorstufen beteiligt sein (143, 178, 191).

Die Bildung des aktiven Cofaktors TDP durch die Aktivität der Thiaminpyrophosphokinase findet in Hefen und Säugern ausschließlich im Cytosol statt (50, 85). Die meisten TDP-abhängigen Enzyme – Acetolactatsynthase, Pyruvat-Dehydrogenase und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase – sind jedoch in Mitochondrien lokalisiert. Nach den mitochondriellen Transportproteinen für FAD (258), Folat (255) und Coenzym A (203) wurde auch der Transporter für TDP identifiziert (157). Das von *TPC1* kodierte Protein gehört wie die anderen Transporter zur „mitochondrial carrier family“. Es

katalysiert den Import von TDP sowie den Austausch von TDP gegen TMP, das in den Mitochondrien durch die Aktivität einer Thiaminpyrophosphatase entsteht (11).

### **II.A.4.3. Thiamin reguliert die Expression bestimmter Gene**

Die Repression der an einem Stoffwechsel beteiligten Gene bzw. die Regulation der Enzymaktivität durch das entstehende Endprodukt ist ein konservierter Mechanismus, der ubiquitär zu finden ist. So unterliegt auch die Expression der *THI*-Gene, deren Produkte für Thiaminbiosynthese und -transport verantwortlich sind, der Kontrolle durch Thiamin. Damit wird der Energieaufwand, der mindestens fünf Phosphorylierungen pro Molekül TDP beträgt, minimal gehalten. Bereits in früheren Studien wurde ein reprimierender Einfluss von Thiamin, das dem Medium zugesetzt wurde, beobachtet (114, 225, 227, 228, 295, 296). In *S. pombe* unterbindet Thiamin außerdem die Agglutination und Zygotenbildung (227).

Neuere Transkriptionsanalysen belegen, dass sowohl in der Bäcker- als auch in der Spaltheefe die Expression einer Vielzahl von Genen, deren Produkte hauptsächlich eine Rolle in der Biosynthese und im Transport spielen, durch Thiamin reguliert wird. In *S. cerevisiae* sind 62 Gene mindestens 2fach (bzw. 20 Gene 10-90fach) und in *S. pombe* 20 Gene 2-70fach bei Thiaminmangel induziert (Tab. 2.1, (103, 178, 195)). Sowohl in den Bäcker- als auch Spalthefemutanten *thi80* bzw. *tnr3*, deren Thiamin-Pyrophosphokinase defekt ist, ist die thiaminabhängige Genexpression dereguliert, d.h. konstitutiv aktiv. Deshalb wurde postuliert, dass TDP das intrazelluläre Signalmolekül für die Repression ist (61, 188).

In *S. cerevisiae* konnten drei positive Regulatoren – Thi2, Thi3 und Pdc2 – identifiziert werden, die an der Weiterleitung des Thiamin-Signals beteiligt sind (85, 186, 187). Thi2 trägt eine Zn<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub>-DNA-Bindedomäne, wie sie auch in Gal4 aus *S. cerevisiae* zu finden ist, und repräsentiert damit einen klassischen Transkriptionsfaktor. Thi3 ist homolog zu Isozymen der Pyruvatdecarboxylase aus Hefe und zeigt Aktivität als 4-Methyl-2-oxopentanoat Decarboxylase im Abbauweg von Leucin zu Isoamylalkohol (52). Es enthält ein TDP-Bindemotiv GDGX<sub>24-27</sub>NN, welches nur in TDP-abhängigen Enzymen vorkommt (32), womit es die Funktion eines Sensors übernehmen könnte, der die intrazelluläre TDP-Konzentration feststellt (195). Da es selbst kein DNA-Bindemotiv und keine Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren besitzt, kann es die Information nur durch Protein-Protein-Interaktion – mit Thi2 und möglichen weiteren Proteinen – an die Transkriptionsmaschinerie weitergeben (Abb. 2.3 A). Diese Sensor-Hypothese wird dadurch gestützt, dass Thi3 zu einem konstitutiven Aktivator wurde, wenn die für die TDP-Bindung essentiellen Aminosäuren mutiert wurden. TDP bewirkt vermutlich eine Konformationsänderung von Thi3, die die Wechselwirkung mit z.B. Thi2 abschwächt und zum Zerfall des Transkriptionskomplexes führt. Die Folge ist die Repression der *THI*-Gene (195).



	Gen	Induktion <sup>a</sup>	Funktion
<i>S. cerevisiae</i>	<i>THI13</i>	90,3	HMP-P precursor synthesis
	<i>THI4</i>	>80,8 <sup>b</sup>	Thiaminphosphate precursor synthesis
	<i>THI12</i>	>77,4 <sup>b</sup>	HMP-P precursor synthesis
	<i>THI5</i>	>74,5 <sup>b</sup>	HMP-P precursor synthesis
	<i>PET18</i>	57,9	HMP-P precursor synthesis
	<i>THI11</i>	55,0	HMP-P precursor synthesis
	<i>PDC5</i>	>50,7 <sup>b</sup>	Pyruvate decarboxylase
	<i>PHO3</i>	43,1	Acid phosphatase, thiamine utilization
	<i>SNZ3</i>	36,5	Vitamin B <sub>6</sub> metabolism, HMP-P precursor synthesis?
	<i>YLR004C</i>	34,6	Thiamine precursor transporter?
	<i>THI20</i>	29,3	HMP kinase and HMP-P kinase
	<i>SNZ2</i>	26,9	Vitamin B <sub>6</sub> metabolism, HMP-P precursor synthesis?
	<i>THI7 (THI10)</i>	24,8	Thiamine transporter
	<i>THI22</i>	21,0	HMP-P precursor transporter?
	<i>SNO3</i>	17,7	Vitamin B <sub>6</sub> metabolism, HMP-P precursor synthesis?
	<i>THI2</i>	17,3	Positive regulator factor for <i>THI</i> genes
	<i>SNO2</i>	16,1	Vitamin B <sub>6</sub> metabolism, HMP-P precursor synthesis?
	<i>YOR192C</i>	15,4	Thiamine precursor transporter?
	<i>THI6</i>	14,0	Thiamine-phosphate pyrophosphorylase and thiamine kinase
	<i>THI21</i>	11,4	HMP kinase and HMP-P kinase
<i>S. pombe</i>	<i>nmt2<sup>+</sup> (thi2<sup>+</sup>)</i>	71,6	thiamine biosynthesis
	<i>nmt1<sup>+</sup> (thi3<sup>+</sup>)</i>	47,7	thiamine biosynthesis
	<i>bsu1<sup>+</sup></i>	27	pyridoxine uptake
	<i>anc1<sup>+</sup></i>	22,5	mitochondrial ADP/ATP carrier
	SPBP8B7.18c	20,5	thiamine biosynthesis, HMP-P kinase
	<i>pho4<sup>+</sup></i>	15,2	TDP phosphatase
	SPAC9.10	12	thiamine uptake
	<i>thi4<sup>+</sup></i>	8,9	thiamine biosynthesis
	SPCC162.03	8,9	short chain dehydrogenase
	SPBC1604.04	6,9	mitochondrial TDP carrier
	SPCC794.03	5,2	similar to choline transporter HNMI
	SPCC18B5.05c	3,6	thiamine biosynthesis, HMP-P kinase
	<i>mfm2<sup>+</sup></i>	3,5	mating factor precursor
	SPCC31H12.06	3,5	sequence orphan
	SPBC36.02c	3,5	similar to spermidine transporter TPO1
	SPBC21H7.03c	3,4	acid phosphatase
	<i>thi5<sup>+</sup></i>	2,6	transcription factor
	<i>snz1<sup>+</sup></i>	2,6	pyridoxine biosynthesis
	SPAC29A4.12c	2,3	sequence orphan
	<i>zym1<sup>+</sup></i>	2,3	metallothionein

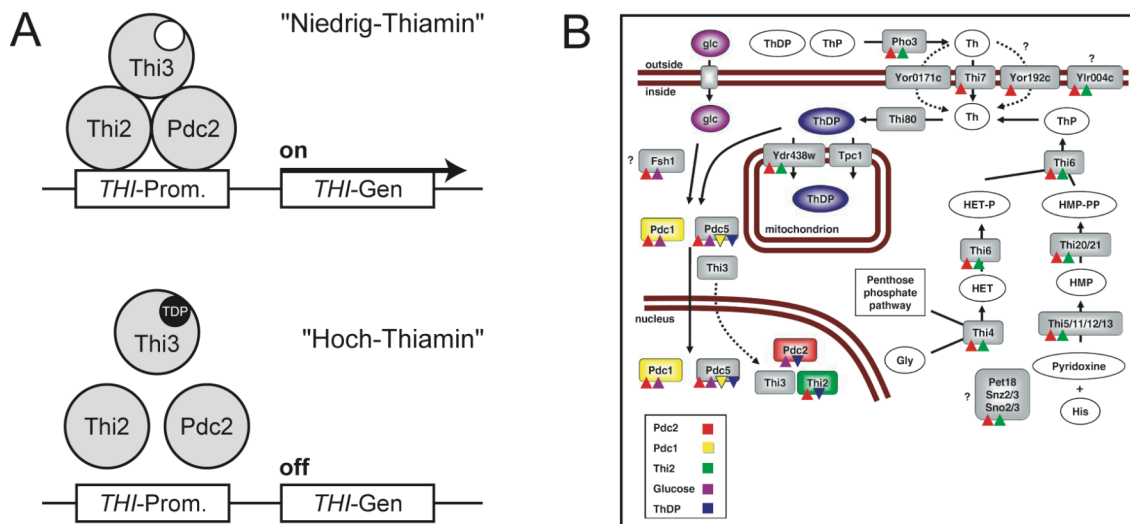
**Tab. 2.1. Thiaminmangel induziert die Expression bestimmter Gene in *S. cerevisiae* und *S. pombe*.** Übersicht der Gene, die mindestens 2fach (*S. pombe*) bzw. mindestens 10fach (*S. cerevisiae*) in Medium ohne bzw. mit 10 nM Thiamin induziert waren (aus Jenkins et al. (103) und Nosaka et al. (195))

<sup>a</sup> Verhältnis des Expressionssignals in Medium ohne (*S. pombe*) bzw. mit 10 nM (*S. cerevisiae*) Thiamin zu dem in Medium mit 30 µM bzw. 1 µM Thiamin

<sup>b</sup> Das Expressionssignal war maximal und deshalb sollte das tatsächliche Signal und damit das Verhältnis größer als der angegebene Wert sein

Während in *thi3Δ* Mutanten die Expression aller *THI*-Gene stark reduziert ist, hat die Deletion von *THI2* keine Auswirkung auf die Expression von *THI7* oder *THI2* selbst (59, 186, 187, 192, 194). Der dritte Faktor, *PDC2*, kodiert für ein Protein, das im Nukleus lokalisiert ist und in verschiedenen Hefen die Expression von Genen reguliert (84, 109, 202, 256). Er enthält eine putative N-terminale DNA-Bindedomäne, welche der des „centromere binding proteins“ (CEBP) ähnlich ist, sowie eine Asparagin-reiche Box (ARB), die Protein-Protein-Interaktionen erlaubt. Obwohl eine Funktion als Transkriptionsfaktor bislang nicht nachgewiesen werden konnte, ist bekannt, dass Pdc2 für die Expression der Pyruvatdecarboxylase-Isozyme *PDC1* und *PDC5* sowie der *THI*-Gene nötig ist (85, 256). Es scheint dabei direkt auf die Promotoren seiner Zielgene zu wirken und nicht auf eine Komplexbildung mit Thi2 oder Thi3 angewiesen zu sein. Eine mögliche Funktion von Pdc2 könnte eine Vermittlerrolle zwischen dem Glukosestoffwechsel und dem Bedarf an TDP in der Zelle sein. Dafür spricht, dass *thi2Δ* und *thi3Δ* Mutanten nur dann auxotroph für Thiamin sind, wenn Glukose als Kohlenstoffquelle dient und nicht, wenn sie auf Ethanol wachsen (178). Denn nur bei der Verwertung von Glukose werden aktive, mit TDP beladene Abbauenzyme, wie Pyruvat-Dehydrogenase oder Pyruvatdecarboxylase, benötigt.

Die Expression der *THI*-Gene wird also durch zwei Stimuli induziert. Zum einen durch Thiaminmangel, der durch Thi2/Thi3 und Pdc2 weitergeleitet wird, zum anderen durch die Anwesenheit von Glukose als Kohlenstoffquelle. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 2.3. B eine Übersicht der Thiamin-abhängigen Genregulation dargestellt (178).



**Abb. 2.3. Die Regulation der Genexpression durch TDP in *S. cerevisiae*.** (A) Das hypothetische Modell der TDP-abhängigen Regulation postuliert, dass Thi3 bei Thiaminmangel einen Komplex mit Thi2 und Pdc2 ausbildet, der die Transkription von *THI*-Genen aktiviert. Bei einer hohen intrazellulären TDP-Konzentration hingegen bindet Thi3 TDP (●), wodurch der Komplex zerfällt und die Transkription nicht induziert wird. Nach Nosaka et al. (191) (B) Regulation der an Thiaminbiosynthese und -transport beteiligten Genprodukte. Regulatoren sind durch graue Rechtecke, Enzyme der Biosynthese und Transportproteine durch farbige Dreiecke und Metabolite durch Ovale dargestellt. Die farbigen Dreiecke repräsentieren die positive (▲) bzw. negative (▼) Regulation durch den jeweiligen Regulator. Aus Mojzita et al. (178).

In *S. pombe* diente die thiaminabhängig regulierte saure Phosphatase Pho4 als Reporter, um Mutanten zu identifizieren, deren Phosphatase-Aktivität nicht mehr durch Thiamin reprimiert werden konnte bzw. trotz Abwesenheit von Thiamin nicht induziert war. Insgesamt wurden vier Mutanten isoliert, in denen die Expression nicht nur von *pho4*<sup>+</sup>, sondern auch von *thi2*<sup>+</sup>, *thi3*<sup>+</sup> und *thi4*<sup>+</sup> dereguliert war: *tnr1*, *tnr2* und *tnr3* und *thi1*<sup>+</sup> (226).

Die *tnr* Gene („thiamine *non* repressible“), von denen bisher *tnr3*<sup>+</sup> als einziges kloniert wurde, wirken dabei als negative Regulatoren. Bei Tnr3 handelt es sich um die Thiamin-Pyrophosphokinase (TPK), da sein C-Terminus sehr homolog zu seinem Ortholog Thi80 aus *S. cerevisiae* ist und *tnr3* Mutanten sowohl eine stark erniedrigte intrazelluläre TDP-Konzentration als auch TPK-Aktivität zeigen. Außerdem ist *tnr3*<sup>+</sup> in der Lage, eine *S. cerevisiae thi80* Mutante zu komplementieren (61). Wie bereits erwähnt, weist die Tatsache, dass in Mutanten mit einer reduzierten TPK-Aktivität die TDP-Konzentration erniedrigt und die Genexpression dereprimiert ist, eindeutig darauf hin, dass TDP die Funktion eines intrazellulären Signals besitzt.

Thi1 wirkt als positiver Regulator auf die Expression von Genen, z.B. auf die von *nmt1*<sup>+</sup> (60, 226, 253, 295). Er besitzt hohe Homologie zu Transkriptionsfaktoren mit einer Cys<sub>6</sub>-Zinkfinger Domäne, deren bekanntester Vertreter Gal4 aus *S. cerevisiae* ist, jedoch keine signifikante Ähnlichkeit mit Thi2 aus *S. cerevisiae*. *thi1* Mutanten sind auxotroph für Thiamin und zeigen Defekte bei der Expression von *pho4*<sup>+</sup> und beim Thiamintransport. Da kein anderer Phänotyp erkennbar ist, scheint Thi1 speziell auf aktivierende Bereiche von Genen des Thiaminmetabolismus zu wirken. Zurlinden und Schweingruber (297) identifizierten ein TR („thiamine regulatory“) Element im Promotor von *nmt1*<sup>+</sup>, das für die Aktivierung der Expression in Abwesenheit von Thiamin verantwortlich ist und Ähnlichkeit zur Bindestelle des Transkriptionsfaktors C/EBP (CAAT/Enhancer Binding Protein) aus Säugern besitzt. Seine Konsensussequenz lässt sich auch in den Promotoren der thiaminregulierten Gene *thi4*<sup>+</sup>, *bsu1*<sup>+</sup> und *pho4*<sup>+</sup> finden (Abb. 2.4). Allerdings ist die Sequenz des TR Elements nicht sehr spezifisch und in rund 70% aller Promotoren mit einer Länge von 400-800 bp mindestens einmal enthalten (297).

C/EBP Motiv			<b>T</b>	K	N	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	
<i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	-61		<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	-51
<i>thi4</i> <sup>+</sup> Promotor	-184		<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	-175
<i>pho4</i> <sup>+</sup> Promotor	-508		<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	-499
<i>bsu1</i> <sup>+</sup> Promotor	-13		<b>T</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	-6

**Abb. 2.4. Das TR-Element.** Vergleich der Consensussequenz des TR-Elements in thiaminregulierten Promotoren mit dem Bindemotiv des Transkriptionsfaktors C/EBP aus Säugern (K = G/T, Y = C/T). Die Position der TR-Elemente bezieht sich dabei auf das jeweilige Start-ATG (+1).

Durch Mobility Shift Assays konnte die spezifische Bindung eines Komplexes an das TR-Element nachgewiesen werden, die unabhängig von der Anwesenheit von Thiamin war und auch in einem *thi1Δ* Knockout zu sehen war. Das bedeutet, dass Thi1 nicht direkt an der Komplexbildung und DNA-Bindung beteiligt ist und die Expression des Transkriptionsfaktors selbst nicht durch Thiamin reguliert wird (297). McQire et al. (163) identifizierten mit Thi5 einen weiteren positiven Regulator der

thiaminregulierten Genexpression (163). Er besitzt ebenfalls ein Cys<sub>6</sub>-Zinkfinger DNA-Bindemotiv und ist zu 24% mit Thi1 identisch. Als Heterodimer mit Thi1 könnte er als Transkriptionsfaktor auf thiaminkontrollierte Promotoren wirken. Die genaue Funktion von Thi5 ist allerdings noch ungeklärt. In neueren Transkriptomanalysen, in denen die Induktion der Genexpression durch Thiaminmangel untersucht wurde, ließen sich viele der von Schweingruber et al. identifizierten, thiaminregulierten Gene wieder finden (103). Die zusätzlichen, in ihrer Funktion noch unbekannten Gene könnten helfen, die bislang unverstandenen Schritte sowohl des Thiaminmetabolismus als auch der Regulation durch Thiamin zu klären.

Der *nmt1*<sup>+</sup> Promotor war Grundlage für die Konstruktion der thiaminregulierten pREP-Expressionsvektoren für *S. pombe* (161). Basi et al. (12) fanden, dass die schrittweise Deletion der TATA-Box im *nmt1*<sup>+</sup> Promotor eine graduelle Abnahme der Aktivität eines Reportergens zur Folge hatte, der Transkriptionsstart jedoch unbeeinflusst blieb. Sogar die basale Expression war in Gegenwart von Thiamin durch die mutierten Promotoren sehr stark erniedrigt. Demnach scheint dieses Promotorelement neben dem TR Element ebenfalls eine sehr entscheidende Rolle bei der thiaminkontrollierten Genexpression zu spielen. Auf diese Weise ließen sich Expressionsvektoren konstruieren, die sich besonders für Gene eignen, deren Produkte schon in niedriger Konzentration aktiv bzw. toxisch sind.

## **II.A.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

Die Erforschung der Thiaminaufnahme in Bäckerhefe geht zurück auf Iwashima et al., die 1973 den Carrier-vermittelten Transport von Thiamin in *S. cerevisiae* erkannt und beschrieben haben. Seitdem wurden Transportprozesse für Vitamin B<sub>1</sub> auch bei anderen Organismen nachgewiesen. Um nicht nur die Aufnahme hinsichtlich ihrer Substratspezifität oder ihrer Kinetik zu charakterisieren, sondern auch ihre Regulation zu ergründen, ist es notwendig, die dafür verantwortlichen Proteine zu identifizieren.

Da auch Spaltheife in der Lage ist, Thiamin durch einen aktiven und proteinvermittelten Prozess aufzunehmen (225, 257), ging ich in meiner Diplomarbeit der Aufgabenstellung nach, das entsprechende Transportprotein in *S. pombe* zu identifizieren, das für die Thiaminaufnahme verantwortlich ist (265). Dazu wurde die Strategie verfolgt, eine thiaminauxotrophe biosynthese- und transportdefiziente Bäckerhefemutante, die nur auf sehr hohen Thiaminkonzentrationen wachsen konnte, mit einer cDNA Genbank aus *S. pombe* zu transformieren. Anschließend wurde nach Transformanten gesucht, denen es mithilfe eines Multicopy-Suppressors wieder möglich war, auf niedrigeren Thiaminkonzentrationen zu wachsen. Als einziges Gen war SPAC9.10 in der Lage, den Phänotyp dieser Mutante zu komplementieren. Um eine Funktion als Thiamintransporter nachzuweisen, wurde die Aufnahmeaktivität von *S. pombe* Wildtypzellen mit der von Deletionsmutanten in SPAC9.10 verglichen. Allerdings war kaum ein Unterschied im

Transportvermögen der beiden Stämme sichtbar. Da das Protein außerdem große Ähnlichkeiten zu Aminosäurepermeasen aus *S. cerevisiae* aufwies, wurde die Beteiligung des Genprodukts von SPAC9.10 an der Thiaminaufnahme in Frage gestellt.

In einem unabhängigen Ansatz versuchte Cornelia Klein in ihrer Diplomarbeit, den Thiamintransporter in *S. pombe* zu identifizieren (121). Sie deletierte in der von Schweingruber et al. (225) isolierten und transportdefizienten *ptr1-5* Mutante, zusätzlich das Biosynthesegen *nmt2<sup>+</sup>*, was dazu führte, dass die resultierende Doppelmutante nur bei einer sehr hohen Thiaminkonzentration (12 µM), die passive Diffusion in die Zellen erlaubte, wachsen konnte. Diese Zellen transformierte sie mit einer genomischen DNA Bank aus *S. pombe* und suchte nach Transformanden, denen es aufgrund eines Suppressors möglich war, wieder auf einer niedrigeren Thiaminkonzentration (0,12 µM) zu wachsen. Auch diesmal war SPAC9.10 das einzige Gen, das den Phänotyp der *ptr1-5 nmt2Δ* Mutante zu heilen vermochte. Da sich eine SPAC9.10Δ Mutante bezüglich des Wachstumsphänotyps und der Pyriithiaminresistenz identisch zu *ptr1-5* Zellen verhielt, ging sie der Frage nach, ob SPAC9.10 mit dem *ptr1-5* Locus allelisch ist, was sie in Kreuzungsexperimenten nachweisen konnte. Der Grund für die stark verringerte Aufnahmeaktivität von *ptr1-5* Zellen war der Austausch des konservierten Glutamats 81 gegen Lysin im N-terminalen Bereich, dicht vor der ersten Transmembranspanne. Diese Punktmutation hatte auch eine starke Misslokalisierung des SPAC9.10-GFP Fusionsproteins zur Folge. Bei dem Genprodukt von SPAC9.10 handelte es sich folglich aller Wahrscheinlichkeit nach um den gesuchten Thiamintransporter in *S. pombe*. Allerdings gelang es auch Cornelia Klein während ihrer Diplomarbeit nicht, dem Genprodukt von SPAC9.10 durch Aufnahmetests eine eindeutige Transportaktivität für Thiamin zuzuschreiben.

Deshalb war die primäre Aufgabenstellung dieser Arbeit, die Bedingungen der Aufnahmetests für Thiamin zu optimieren, so dass eine genaue Charakterisierung der Kinetik und Substratspezifität des putativen Thiamintransporters möglich war.

Des Weiteren sollte die Regulation der Genexpression von SPAC9.10 durch Thiamin näher untersucht werden.

## II.B. Material und Methoden

### II.B.1. Material

#### II.B.1.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial (siehe I.B.1.1)

#### II.B.1.2. Geräte (siehe I.B.1.2)

#### II.B.1.3. Datenbanken, Internetdienste und Software (siehe I.B.1.3)

#### II.B.1.4. Organismen

##### *S. cerevisiae* Stämme

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
BY4742	Mat $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	(25)
CVY2	BY4742 <i>thi71<math>\Delta</math>::LEU2 thi72<math>\Delta</math>::LYS2</i>	(265)
CVY3	BY4742 <i>thi7<math>\Delta</math>::kanMX4 thi71<math>\Delta</math>::LEU2 thi72<math>\Delta</math>::LYS2</i>	(265)
CVY4	BY4742 <i>thi4<math>\Delta</math>::his5<sup>+</sup> thi7<math>\Delta</math>::kanMX4 thi71<math>\Delta</math>::LEU2 thi72<math>\Delta</math>::LYS2</i>	(265)

##### *S. pombe* Stämme

Name	Genotyp	Quelle/Referenz
FY254 („Wildtyp“)	<i>ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	(139)
<i>ptr1</i>	<i>ptr1-5 pho1<sup>+</sup> pho4-44? ade6-M210 can1-1 ura4-D18 h90</i>	(121)
<i>ptr1 nmt2<math>\Delta</math></i>	<i>ptr1-5 nmt2<math>\Delta</math>::kanMX4 pho1<sup>+</sup> ade6-M210 ura4-D18 h<sup>+</sup></i>	(121)
<i>tnr3</i>	<i>tnr3-5 pho1-44 leu1-32 h<sup>+</sup></i>	(226)
<i>bsu1<math>\Delta</math></i>	FY254; <i>bsu1<math>\Delta</math>::kanMX4 ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	(245)
<i>bsu1<math>\Delta</math> thi9<math>\Delta</math></i>	FY254; <i>bsu1<math>\Delta</math>::kanMX4 thi9<math>\Delta</math>::LEU2 ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	DA
<i>nmt2<math>\Delta</math></i>	FY254; <i>nmt2<math>\Delta</math>::kanMX4 ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	Stolz, J.
<i>thi7<math>\Delta</math></i>	FY254; <i>thi7<math>\Delta</math>::kanMX4 ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	Stolz, J.
<i>thi7-GFP</i>	FY254; <i>thi7::(pBS-thi7-GFP) ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	(121)
<i>ptr1-GFP</i>	<i>ptr1::(pBS-thi7-GFP) ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	(121)
<i>thi7-3HA</i>	FY254; <i>thi7::(pBS-thi7-3HA) ade6-M210 can1-1 leu1-32 ura4-D18 h<sup>-</sup></i>	(121)

## II.B.1.5. Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
YEplac195-GFP2	YE-type Shuttlevektor, der die Fusion von <i>gfp</i> an das 3'-Ende eines Gens erbaut; 6203 bp, <i>ori</i> , <i>bla</i> , 2 $\mu$ , <i>URA3</i>	(69, 152)
YEplac195-THI7-GFP	Translationale Fusion von <i>THI7</i> an <i>gfp</i> <i>THI7</i> wurde ohne Stop-Codon und mit einer 640 bp langen Promotorregion als <i>SpeI/BamHI</i> Fragment in <i>XbaI/BamHI</i> von YEplac195-GFP2 inseriert	(265)
pFL61- <i>thi9</i> <sup>+</sup>	PCR Produkt von <i>thi9</i> <sup>+</sup> in <i>NotI</i> von pFL61 kloniert	Stolz, J.
pREP3x	<i>E. coli-S. pombe</i> Shuttlevektor, <i>ori</i> , <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>ura4</i> <sup>+</sup> , <i>ars1</i> , <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	(161)
pURSP1- <i>nmt2</i> <sup>+</sup>	Genbankplasmid mit genomischer DNA aus <i>S. pombe</i> , Insert enthält <i>nmt2</i> <sup>+</sup>	(10)
pURSP1- <i>thi9</i> <sup>+</sup>	Genbankplasmid mit genomischer DNA aus <i>S. pombe</i> , Insert enthält <i>thi9</i> <sup>+</sup>	(10)
p426-GPD- <i>bsu1</i> <sup>+</sup>	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , <i>ori</i> , <i>amp</i> <sup>R</sup> , 2 $\mu$ , <i>URA3</i> , GPD-Promotor	(182)

## II.B.1.6. Medien, Puffer und Lösungen

### II.B.1.6.1. Medien für *S. cerevisiae* und *S. pombe*

- Stammlösungen von Aminosäuren und Nukleobasen  
Mit Ausnahme von Tryptophan, das steril filtriert und im Dunkel gelagert werden muss, können alle anderen Stammlösungen autoklaviert werden. Die Endkonzentration im Medium betrug jeweils 1x.

<i>S. cerevisiae</i>	100x Adenin (2 g/l), 100x Histidin (2 g/l), 100x Methionin (2 g/l), 100x Leucin (3 g/l), 100x Lysin (3 g/l), 100x Tryptophan (2 g/l), 100x Uracil (2 g/l)
<i>S. pombe</i>	15x Adenin (3,75 g/l), 30x Leucin (7,5 g/l), 10x Uracil (2,5 g/l)

- Vitamin-Mix ohne Thiamin  
100  $\mu$ l Biotin (100 mg/l), 100  $\mu$ l Ca-Panthotensäure (20g/l), 500  $\mu$ l Folsäure (20 mg/l),  
500  $\mu$ l Inositol (20 g/l), 500  $\mu$ l Niacin (4 g/l), 500  $\mu$ l p-Aminobenzoesäure (2 g/l),  
500  $\mu$ l Pyridoxin/HCl (4 g/l), 5 ml Riboflavin (200 mg/l)  
Nach der Zugabe von 1640  $\mu$ l pro Liter Medium besaßen die Vitamine dieselben Konzentrationen wie in Standardmedien.
- EMM (Edinburgh Minimal Medium, (176))  
Minimalmedium für Flüssigkulturen von *S. pombe* ohne Pyridoxin und Thiamin. Die Salze werden mit 2% Glukose autoklaviert. Aminosäuren, Nukleobasen, Vitamine und Mineralien werden zugegeben, so dass die Endkonzentration 1x beträgt. Das Medium besitzt einen pH Wert von 3,8.

Salze	NH <sub>4</sub> Cl (5 g/l), Kaliumhydrogenphthalat (3 g/l), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,2 g/l), CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O (14,7 g/l), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,04 g/l), KCl (1 g/l), MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O (1,05 g/l)
1000x Vitamin-Mix	Biotin (10 mg/l), Pantothensäure (1 g/l), Nicotinsäure (10 g/l), Myo-Inositol (10 g/l)
10.000x Mineralien-Mix	Molybdat (0,4 g/l), CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O (0,4 g/l), Citrat (10 g/l), Kaliumiodid (1 g/l), FeCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O (2 g/l), MnSO <sub>4</sub> (4 g/l), ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O (4 g/l), Borat (5 g/l)

- SD (Synthetic Dextrose)  
Minimalmedium für *S. cerevisiae*, SD-Platten wurden auch für *S. pombe* verwendet  
0,67% YNB ohne Aminosäuren, 2% Glukose, 2% Agar (für Platten)
- SD ohne Thiamin  
0,67% YNB ohne Aminosäuren ohne Vitamine (Qbiogene), 2% Glukose,  
2% Bacto Agar (für Platten)  
Nach dem Autoklavieren und Abkühlen: Zugabe von Aminosäuren, Nukleobasen und  
Vitamin-Mix ohne Thiamin
- YPD  
Vollmedium für *S. cerevisiae* und *S. pombe*  
1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose, 2% Agar (für Platten)

## II.B.1.6.2. Puffer und Lösungen

AE-Puffer	50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,3 (mit Essigsäure)
AE-äquilibriertes Phenol	Saures Phenol (Roti®-Aqua-Phenol) mit 100 ml AE-Puffer überschichten, schütteln und Phasentrennung abwarten. Die wässrige Phase sollte einen pH-Wert von 5,3 haben. Falls nicht, Vorgang wiederholen. Zweiphasengemisch fest verschlossen im Kühlschrank aufbewahren.
Hybridisierungslösung (Church Buffer)	7% SDS, 0,5 M NaPO <sub>4</sub> (1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,2), 1 mM EDTA
10x MOPS	0,2 M MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Na-Acetat, pH 7,0 (mit NaOH)
RNA-Ladepuffer	1,1x MOPS, 4,6% Glycerin, 5,7% gesättigte Bromphenolbau-Lösung (v/v), 7,4% Formaldehyd, 57% Formamid (v/v) bei -20°C lagern
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natriumcitrat, pH 7,0 (mit HCl)
Transportpuffer (pH 4,5) (162)	27,2 ml 100 mM Zitronensäure, 22,8 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 50 ml ddH <sub>2</sub> O
Waschlösung 1	2x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 2	0,1x SSC, 0,1% SDS



## **II.B.2. Methoden**

### **II.B.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **II.B.2.1.1. RNA Isolierung**

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der „Hot Phenol“ Methode (223). Alle Lösungen wurden mit DEPC behandelt und autoklaviert, Glaswaren und Bestecke wurden bei 180°C sterilisiert. Je 25 OD Zellen wurden bei 4°C geerntet, mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O/DEPC gewaschen, in ein Schraubdeckelgefäß überführt und das Pellet entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Die (gefrorenen) Zellen wurden in 400 µl AE-Puffer aufgenommen und mit 40 µl SDS (10%) und 440 µl AE-äquilibriertes Phenol versetzt. Nach einer 4-minütigen Inkubation bei 65°C wurden die Proben sofort in (-80°C) vorgekühltem techn. Ethanol abgekühlt, bis das Phenol kristallisiert war. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, mit 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, nachdem 1 min kräftig gevortext wurde. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation (2 min, Raumtemperatur) und die obere Phase wurde mit 1/10 Volumenteil 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 2,5 Volumenteile -20°C kaltem Ethanol versetzt und durch Invertieren gemischt. Die RNA wurde für mindestens 1 Stunde bei -20°C gefällt und anschließend durch Zentrifugation (5 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit 500 µl Ethanol (-20°C) gewaschen. Das trockene Pellet wurde in 50 µl ddH<sub>2</sub>O/DEPC aufgenommen und die isolierte RNA spektroskopisch quantifiziert.

#### **II.B.2.1.2. Northern Blot Analyse**

Die RNA wurde auf Formaldehyd-Gelen aufgetrennt. Diese bestanden aus 0,56 g Agarose, 5,5 ml 10x MOPS, 46 ml ddH<sub>2</sub>O, 2,9 ml Formaldehyd und 2 µl Ethidiumbromid. 10 µg RNA (in einem Volumen von 10 µl) wurden mit 35 µl Ladepuffer versetzt, gevortext, abzentrifugiert und 2 min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Proben auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte in 1x MOPS für 2-4 Stunden bei 60-80 V. Anschließend wurde das Gel mit einem Lineal fotografiert.

Die RNA wurde über Nacht durch Kapillarblot in 20x SSC auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und, nachdem die Membran kurz in 0,1x SSC geschwenkt wurde, durch UV Licht fixiert.

#### **II.B.2.1.3. Sondenherstellung und Hybridisierung**

Die Sonde wurde mithilfe des HexaLabel DNA Labeling Kits (Fermentas) mit [ $\alpha^{32}$ P]dCTP markiert. Dazu wurden 100 ng Sonden-DNA mit 10 µl 5x Reaktionpuffer versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 40 µl gebracht. Nach der Denaturierung der DNA für 5-10 min in kochendem Wasserbad, wurde sie in einem Eis/Wasserbad abgekühlt und abzentrifugiert. Anschließend wurden 3 µl Mix A, 4 µl [ $\alpha^{32}$ P]dCTP (1,85 MBq) und 1 µl Klenow Fragment zugegeben, gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl des dNTP-Mixes wurde die Probe für weitere 5 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Die markierte Sonde kann entweder sofort verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden, wobei sie dann vor der Verwendung erneut bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt werden muss.

Der Blot wurde zunächst in einer Hybridisierungsröhre mit 10-20 ml Church Buffer für 3 Stunden bei 65°C prä-hybridisiert. Anschließend wurde der Puffer durch 10 ml frischen Hybridisierungspuffer ersetzt und die Sonde dazupipettiert. Nach der Hybridisierung über Nacht bei 65°C wurde der Puffer abgenommen, die Hybridisierungsröhre und der Blot zweimal mit Waschlösung 1 (Raumtemperatur) gespült und 15 min mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit Waschlösung 2 für 30 min bei 68°C. Danach wurde der Blot in Folie eingeschweißt und auf einen Phosphorimager-Screen bzw. Röntgenfilm (Kodak XAR5) exponiert.

### II.B.2.2. Biochemische Methoden – Aufnahmetest mit [<sup>3</sup>H]Thiamin

*S. cerevisiae* Stämme wurden in SD Medium angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,0 bei 4°C geerntet. Sie wurden mit kaltem Wasser sowie kaltem Transportpuffer (pH 4,5) gewaschen. Anschließend wurden sie in diesem Puffer aufgenommen (OD<sub>600</sub> = 10) und bis zur Durchführung des Tests auf Eis gelagert. Das Testvolumen enthielt 500 µl Zellen (OD<sub>600</sub> = 0,5), die zwei Minuten bei 30°C gerührt wurden bevor Glukose (Endkonzentration 1%) zur Energetisierung zugegeben wurde. Durch Zugabe des Substrats zu einer Endkonzentration von 2 µM wurde der Test nach einer weiteren Minute gestartet. Das Substrat war eine Mischung aus [<sup>3</sup>H]Thiamin (1:10 verdünnt) und unmarkiertem Thiamin im Verhältnis 2:10,5 (v/v) mit einer spezifischen Aktivität von 0,19 Ci/mmol. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Ansatz entnommen, auf GN-6 Metrical Membranen (0,45 µm Porengröße) abfiltriert und die Zellen mit 5 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

*S. pombe* Zellen, angeimpft in EMM, wurden bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,0 geerntet und mit kaltem Wasser sowie kaltem EMM (ohne Aminosäurezusätze) gewaschen und in kaltem EMM resuspendiert (OD<sub>600</sub> = 10). Die Durchführung des Aufnahmetests erfolgt wie für *S. cerevisiae* beschrieben. Zur Bestimmung der Energieabhängigkeit wurden die Zellen in EMM ohne Glukose gewaschen, resuspendiert und anschließend für 1 Stunde auf Eis inkubiert, bevor sie in den Test eingesetzt wurden. Die Protonophoren Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) und Carbonylcyanid p-(tri-Fluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) wurden drei Minuten vor dem Substrat, die Kompetitoren wurden zusammen mit dem Substrat zugegeben.

### II.B.2.3. Sonstige Methoden – Wachstumstests

In 96-well Platten wurden Zellsuspensionen in sterilem Wasser mit OD<sub>600</sub> = 0,06, 0,006 und 0,0006 hergestellt und mit einem 48-zähligen Metallstempel auf SD Selektionsplatten übertragen. Das Wachstum wurde nach drei bis fünf Tagen dokumentiert.

## II.C. Ergebnisse

### II.C.1. SPAC9.10 supprimiert den Wachstumsdefekt einer thiamin- auxotrophen Bäckerhefemutante

Der unbekannte ORF SPAC9.10 wurde als Multicopy-Suppressor der Bäckerhefemutante CVY4 identifiziert. In ihr ist neben den Genen *THI7*, *THI71* (= *NRT1*) und *THI72*, deren Genprodukte zum Thiamintransport beitragen, zusätzlich das Biosynthesegen *THI4* deletiert, was zu einem stark ausgeprägten Phänotyp führt. Der Verlust von Vitamin-Transportproteinen in auxotrophen Mutanten kann durch hohe Konzentrationen des Vitamins im Medium komplementiert werden (143, 241-243). So ist der Stamm CVY4 für gutes Wachstum auf 120  $\mu\text{M}$  Thiamin im Medium angewiesen, welches passiv in die Zellen diffundiert. Expressieren diese Zellen das Gen SPAC9.10, wachsen sie bis zu einer Konzentration von 0,012  $\mu\text{M}$  und damit genauso gut wie mit ihrem endogenen Thiamintransporter Thi7 (Abb. 2.5).

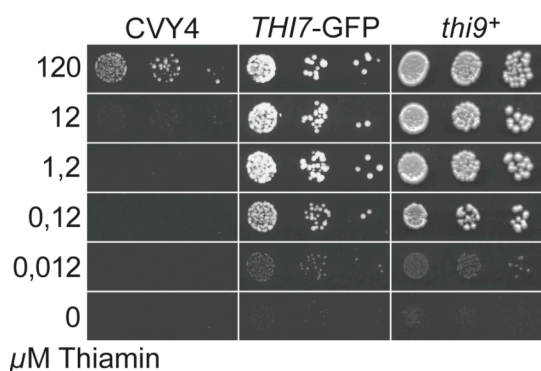


Abb. 2.5. *thi9<sup>+</sup>* komplementiert den Wachstumsdefekt von CVY4. Wachstumstests mit CVY4, transformiert mit einem leeren pFL61 Plasmid (CVY4), mit YEplac195-*THI7*-GFP (*THI7*-GFP) oder pFL61-*thi9<sup>+</sup>* (*thi9<sup>+</sup>*).

Im Folgenden wurde das von SPAC9.10 kodierte Protein näher charakterisiert und eindeutig als Thiamintransporter klassifiziert. In Anlehnung an seinen ORF-Namen wird das Gen deshalb als *thi9<sup>+</sup>* bezeichnet.

### II.C.2. Thi9 besitzt keine Ähnlichkeit zu bekannten Thiamintransportern

Das Gen *thi9<sup>+</sup>* besitzt keine Introns und kodiert für ein Protein mit 591 Aminosäuren. Die Translation könnte alternativ an einem zweiten Start-ATG (+199 bp) beginnen, was den N-Terminus um 66 aa verkürzen würde. Da aber seine homologen Proteine ebenso über einen längeren N-terminalen Bereich verfügen und das interne Methionin nicht konserviert ist, wohl aber der Bereich darum, wurde dies für eher unwahrscheinlich gehalten.

Sp 1 ---MPSSQISH---QDPQLGQTSSGSSSIKEKAEP---QLYAGPIDPARPRD---FOGFGF-----EDVSVYDIDNNELLRKYGYFVLHRSFEFFSEFSAFA  
 Af 1 -----MHAAIVASADAAARAGYKSELENLMSILSLSPA  
 Bc 1 -----LNKSVIIEARDDAQLDNGYKPLVLRHTYTLLENFSTSPA  
 Cn 1 -----  
 Pj 1 MIKV-----FTDFLRRFS---SNSNDHFKQH-FA-----CRGLKLCAEVETGTGRCHSIDDLASFGYKQEBHTMTSTNSFSAFQ  
 Sbj 1 -----MSFRAAGDVAAAGSPDAGGASSPEKDAQSAIVTPSILENNGSQ-----G-----TFPSYEMDEBQALCKYKPLHRSBALPFBSFAFA  
 So 1 MSNVPKADLPTBGDTFVPQRSNTSNSSIFSNENEKVVIHETNDGKHQ-----T-----DGSSDADSDBALHRSYKYPKPLHRTKFFBSFAFA  
 Ss 1 -----VVRGHE-----SKSVIIEARDDAQLDNGYKPLVLRHTYTLLENFSTSPA

Sp 89 SLDVSGVRITSGVIFGCGFAIYWSAMITPFCSTITTAALAEICSAIPAGSGTYLWAAESGPFGRFGRFSLFVAMWSTTAWTTFASITOSTANFPA  
 Af 39 IIAAPFSGSTIMYITLDEOSITIIWGNVLVITISIAHAEASLABICAVPTAGVYVTSISAMLSTKEWAPMSFIDENLVNWNVITLISISGLALNLS  
 Bc 46 ALNFGVGRITITGIASGGPIAYWSILVTCFFPHITAAVAEVCASPSAGSYLWAAEAGGAKGRUGFGEVAMWSTTAWMTFASNTGCAVNNILS  
 Cn 1 -----AEICSAIPLSGSIIYWAAEAAHPKYARLIGFVAMWSTTAWMTFASNTGCAVNNILS  
 Pj 77 CCSITSGSPMIGDVAOSGGSIAIYGNILVITSPGVGSLABICAVPTAGVYVTSISAMLSTKEWAPMSFIDENLVNWNVITLISISGLALNLS  
 Sbj 83 ALDVGVRITITMAGITFAGPASVWSYVITAVCSITHTAAVLAEICSAIPAGSGTYLWAAESGGVYGRFISFLVAMWSTTAWTTFASITOSTANFPA  
 So 89 ALDVGVRITITPSYVIFGGPIAYWWSMLTSCSITHTAAVLAEICSAIPAGSGTYLWAAEAGGPKRFRFESFLVAMWSTTAWTTFASITOSTANFPA  
 Ss 46 ALNFGVGRITITGIASGGPIAYWSILVTCFFPHITAAVAEVCASPSAGSYLWAAEAGGAKGRUGFGEVAMWSTTAWMTFASNTGCAVNNILS

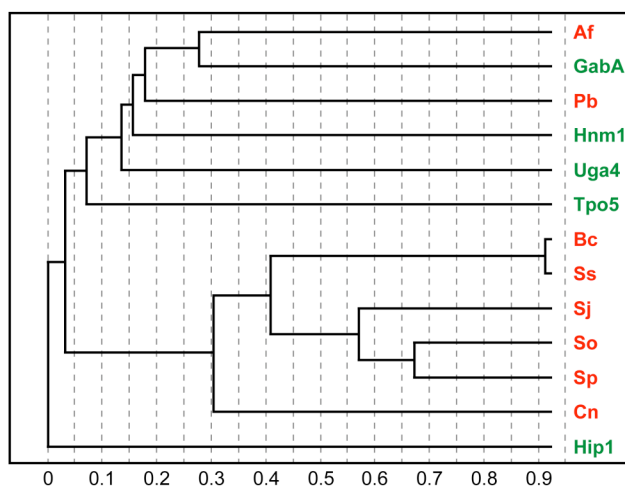
Sp 189 EISTFNNPFI-----IND---SDVKFRAVQNICAEVILVFTVILNVOVPPRYKVFIFASILLFIDVYNNIIVFVTSKPDGRSAKWVFTFTLYDOAGY  
 Af 139 AISTFNNEDFV-----ANAWQIIMRAVWLACAMNNFSSKYLDLANKVC-----IFWTAASVH-----IILNLLS-MADNRRDAALVFGHYDASDGE  
 Bc 146 EIVFNNDFD-----TDT---SDVKFRAVQNICAEVILVFTVILNVOVPPRYKVFIFASILLFIDVYNNIIVFVTSKPDGRSAKWVFTFTLYDOAGY  
 Cn 60 LIIHETIFPFAGDGLT---SNVKFRAVQNIASEVILVFTVILNVOVPPRYKVFIFASILLFIDVYNNIIVFVTSKPDGRSAKWVFTFTLYDOAGY  
 Pj 177 VTCRNPD-----AG-----IY-----OIGFGLVFIHGINSVSYVNGFNQTSVWHLGATLIIIVLAL-----MYPNKSAAKWVFTDFO-NEETGF  
 Sbj 183 EIVFNNDSYK-----TDV---SDVKFRAVQNIASEVILVFTVILNVOVPPRYKVFIFASILLFIDVYNNIIVFVTSKPDGRSAKWVFTFTLYDOAGY  
 So 189 EIVSTFNNNS-----TDD---SNVKFRAVQNICAEVILVFTVILNVOVPPRYKVFIFASILLFIDVYNNIIVFVTSKPDGRSAKWVFTFTLYDOAGY  
 Ss 146 EIVFNNDFDI-----TDT---SDVKFRAVQNICAEVILVFTVILNVOVPPRYKVFIFASILLFIDVYNNIIVFVTSKPDGRSAKWVFTFTLYDOAGY

Sp 283 IKEVDVDDANGNPIASLSKIVFGWVWCLSYFATAGVILGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF  
 Af 222 -----WPSGWAFFGLIQAATLIGGMVAAAGCEVQNPHEVPAALNLSWAAGITSLIYIIPILFVLPTWKD-----ILFSYSPPOF  
 Bc 237 -----APAGWVWCLSYLATAGILGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF  
 Cn 155 -----APAGWVWCLSYLATAGILGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF  
 Pj 260 -----SSNGVWVGLIGLOSYTISGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF  
 Sbj 277 M---DDAG-----TKPVPKWGWCLVIFATAGILGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF  
 So 283 SKEVDYSGNVDNLSKIVFGWVWCLSYLATAGILGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF  
 Ss 237 -----APAGWVWCLSYLATAGILGSDASHIAETBKDASIKAAARGIFSTVTSHTVLSLAILLFCGPDIDFTAILNDNSPOF

Sp 383 FVPIFYSYLLGRGGHVMMNVIIIFELFNNA-VISLACSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-ARGQFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA  
 Af 300 -IGLTKTATGSGGGRLFIILGAAFGIGCSAAASRCTIAARDGALPFRIMRKVKN-RLDVEVYAVLSAAVDCLLGLIYFGSTAAFNSTGVA  
 Bc 315 FVPIFYAVLLGGGHVMMNVIIIFELFNNA-VISLACSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-ARGQFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA  
 Cn 233 FVPIFYALVLRGGAVPMTCIAFGIMNT-SISVASSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-EDGRFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA  
 Pj 383 QMTVGLDGGYKTKYTVFVNLVIGLGRFSG-SALTLCSSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-ARGQFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA  
 Sbj 367 -VNNIYAVLGRGGHVMMNVIIIFELFNNA-VISLACSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-ARGQFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA  
 So 383 FVPIFYSYLLGRGGHVMMNVIIIFELFNNA-VISLACSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-ARGQFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA  
 Ss 315 FVPIFYAVLLGGGHVMMNVIIIFELFNNA-VISLACSRLVFAVARGVLPFSGWLSGVSV-ARGQFNNAVITVIVSALLCTILPSVAFTSLVLSAA

Sp 479 GAPSAAAYLAFGRLEITDRDFPKGWSLGRWSKLCILITVLNVAIVAVNSPYTPYPTVSFNAYAVIMGQVIFPAICTVIVSFWANRYEYB-  
 Af 398 TILCLYSTSGIPILISVVRGRDLKESTLGLAGYAVINAVICVILVFCMISPTVSSNAYVIFAGFATISITWILVIYAKHLE-  
 Bc 411 GAPSAAAYGLIAGRFETIPNFIPTWWSLGRWSKLPFISFWNGVVALFLSPYEPVTAAINYPIMAGVITLAIISWFTFVGWLPRE-RITG  
 Cn 329 CPTETAAAYLISFGRLEITDRDFPKGWSLGRWSKLPFISFWNGVVALFLSPYEPVTAAINYPIMAGVITLAIISWFTFVGWLPRE-RITG  
 Pj 326 TIASSALYFPIAIRLITARKFSGKQDPLGERSNTINILVSCWILFTSVLICTEPTVSNMNYACAVIVFVLGSGGY-  
 Sbj 463 GAPSAAAYLAFGRLEITDRDFPKGWSLGRWSKLCILITVLNVAIVAVNSPYTPYPTVSFNAYAVIMGQVIFPAICTVIVSFWANRYEYB-  
 So 479 GAPSAAAYLAFGRLEITDRDFPKGWSLGRWSKLPFISFWNGVVALFLSPYEPVTAAINYPIMAGVITLAIISWFTFVGWLPRE-RITG  
 Ss 411 GAPSAAAYGLIAGRFETIPNFIPTWWSLGRWSKLPFISFWNGVVALFLSPYEPVTAAINYPIMAGVITLAIISWFTFVGWLPRE-RITG

Sp 578 -----SDSEHSASVK-----ELKV  
 Af 489 -TGPPASA-EVVRARPMVTGKAUVDAENAYSDEMS------KKVEQ  
 Bc 510 EVSECAP-ABGIRQEDGCLQVPEVEGDATPYTSE-----K  
 Cn 428 M---KEEAA-VKVEGKDGQGV-----  
 Pj 520 PRARKWT-GPGRSLEPDCIDGPAVTEYFSPDVKVTSYARHADGENLHHRRGVSVDGDKEL  
 Sbj 563 YVVPHPQ-ESPVQVNEKG-----QWKL  
 So 578 -----PN-FSSN-----KIKN  
 Ss 510 EVSECAP-ABGIRQEDGCLQVPEVEGDATPYTSE-----K



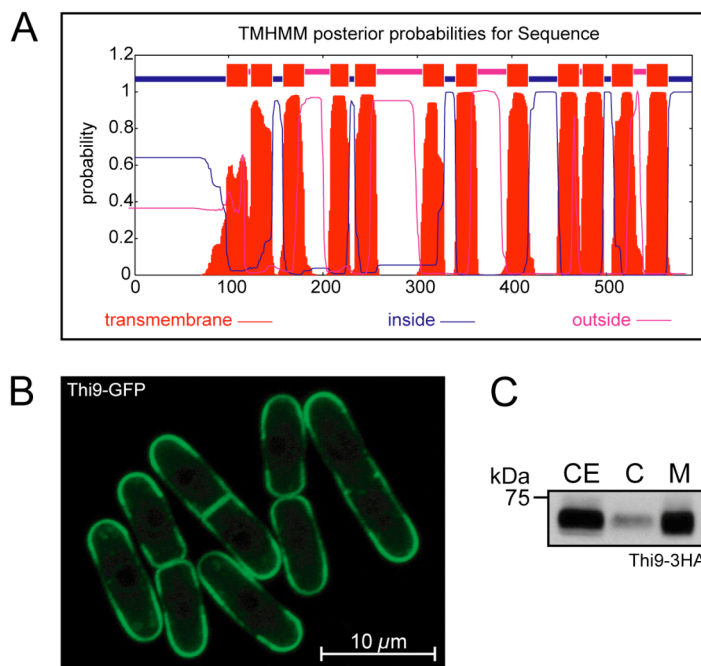
(A) Sequenzvergleich mit Thi9 aus *S. pombe* (Sp, Thi9) und seinen Homologen aus *Aspergillus fumigatus* (Af, AfA14E5.20c), *Botrytis cinerea* (Bc, BC1G\_01240.1), *Cryptococcus neoformans* (Cn, CNA\_G\_05952), *Phycomyces blakesleeanus* (Pb, Phybl1|61967), *Schizosaccharomyces japonicus* (Sj, SJAG\_04673.1), *Schizosaccharomyces octosporus* (So), *Sclerotium sclerotiorum* (Sc, SS1G\_02549). Die putativen Transmembranhelices in Thi9 wurden mithilfe des Vorhersageprogramms TMHMM ermittelt und sind als horizontale Linien dargestellt. Das alternative Start-ATG (\*) sowie der von C. Klein identifizierte Aminosäureaustausch E81K in der *ptr1-5* Mutante sind gekennzeichnet (121). (B) Stammbaum mit Thi9 Homologen und Mitgliedern der TC 2.A.3.4 Superfamilie. Die Analyse und Darstellung erfolgte mit Treetop.

Stark homologe Proteine lassen sich in verschiedenen anderen Vertretern der Ascomyceten, wie *Schizosaccharomyces japonicus*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea* und *Cryptococcus neoformans* finden (Abb. 2.6 A). Keines dieser Homologen jedoch ist funktionell charakterisiert. Die Vorhersagen über ihre enzymatische Aktivität basieren lediglich auf der Ähnlichkeit zu den bekannten Transportern Uga4, Hnm1, Tpo5 und Hip1 aus *S. cerevisiae*, die als Permeasen für  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Cholin, Polyamine bzw. basische Aminosäuren beschrieben sind. Sie gehören zur Familie der ACT (amino acid/choline) Transporter innerhalb der APC (amino acid/polyamine/organocation) Superfamilie (TC 2.A.3.4, (100)). Obwohl Thi9 und Homologe nur eine Identität von rund 20-25% zu den Transportern aus *S. cerevisiae* besitzen, zählen sie – wenn auch nur entfernt – ebenfalls zur APC Superfamilie (100). Dies lässt sich auch in einer Stammbaum-Analyse erkennen, in der die Thi9-Proteine eine distinkte Gruppe bilden (2.6. B). Außer einem positiv geladenen Stickstoffatom lassen sich auch auf Ebene des Substrats keine weiteren Ähnlichkeiten zwischen den meist kettenförmigen, linearen Verbindungen und dem heterozyklischen Thiamin erkennen. Lediglich die Homologen aus *A. fumigatus* und *P. blakesleeana* weisen eine höhere Verwandtschaft zu den Vertretern der ACT Familie auf, was sich auch in ihrer stärkeren Abweichung ihrer Primärstruktur äußert (Abb. 2.6. A).

Thi9 zeigt keine signifikante Ähnlichkeit zu bereits bekannten Thiamintransportern. Die Identität zu dem analogen Protein Thi7 aus *S. cerevisiae* beträgt lediglich 14,3%, die zu den menschlichen Transportern ThTr-1 und ThTr-2 13,7% bzw. 18,3%. Ebenso besteht keine Homologie zum menschlichen Folattransporter (reduced folate carrier, RFC), der hauptsächlich dafür verantwortlich ist, Zellen mit einer anderen Gruppe der B-Vitamine, den Folaten (Vitamin B<sub>9</sub>), zu versorgen. Obwohl Thiamin und Folat unterschiedliche chemische Strukturen besitzen, ist der Folattransporter zu rund 40% mit ThTr-1 und ThTr-2 identisch und in der Lage, durch Anionenaustausch TDP aus und TMP in die Zellen zu transportieren (291, 292).

### **II.C.3. Thi9 ist ein Membranprotein, das den Import von Pyriithiamin vermittelt**

Um fest in der Membran verankert zu sein und mit ihren Loops die notwendige katalytische Oberfläche auszubilden, besitzen viele Membranproteine typischerweise zehn oder zwölf Transmembrandomänen (TMDs) (218). Die Hydropathieanalyse durch das Vorhersageprogramm TMHMM ließ zwölf solcher hydrophoben Bereiche in Thi9 erkennen und sagt eine cytoplasmatische Orientierung des N- und C-Terminus voraus (Abb. 2.7 A). Im Sequenzvergleich mit homologen Proteinen aus anderen Organismen fallen der lange N-terminale Bereich sowie der längere Loop zwischen TMD5/6 in den Thi9 Proteinen der Vertreter der Gattung *Schizosaccharomyces* auf (Abb. 2.6).

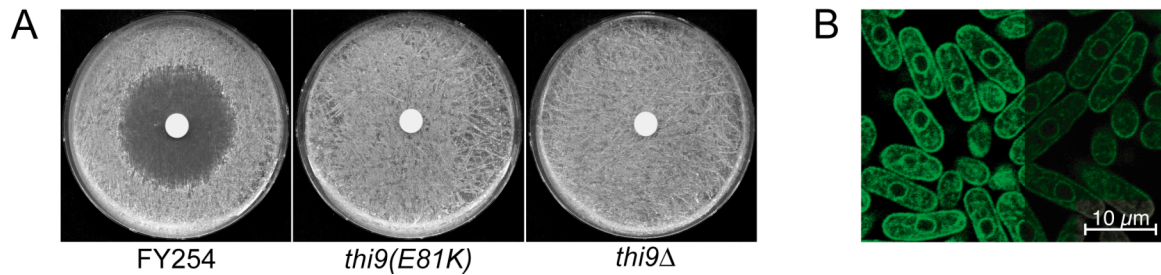


**Abb. 2.7. *thi9*<sup>+</sup> kodiert für ein Plasmamembranprotein.** (A) Hydropathieanalyse von Thi9 mit TMHMM. (B) Lokalisation von Thi9-GFP in der Plasmamembran. Eine C-terminale GFP-Fusion wurde genomisch in *S. pombe* FY254 integriert. Die Zellen wurden in MMA ohne Thiamin angezogen und die Lokalisation von Thi9-GFP durch konfokale Mikroskopie visualisiert (C. Klein, (121)). (C) Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von Thi9 durch Fraktionierung. *S. pombe* Wildtypzellen mit genomisch integrierter, C-terminaler Fusion des 3HA-Epitops an Thi9 wurden drei Tage jeweils in frisches EMM ohne Thiamin überimpft, um sie an Thiamin zu verarmen. Aus einer Übernachtskultur in EMM ohne Thiamin wurden Gesamtzellextrakt (CE), cytosolische Fraktion (C) sowie Membranfraktion (M) isoliert und im Western Blot mit einem anti-HA-Antikörper (sc-805) analysiert.

Cornelia Klein untersuchte in ihrer Diplomarbeit die subzelluläre Lokalisation des Proteins durch eine genomisch integrierte C-terminale Fusion an GFP, wodurch die Funktionalität, d.h. die Sensitivität gegenüber Pyrithiamin, nicht beeinträchtigt wurde. Die Fluoreszenz konnte eindeutig der Plasmamembran zugeordnet werden und trat hauptsächlich an den Zellpolen und den Septen von sich teilenden Zellen auf, wie es bereits auch für andere Plasmamembranproteine in *S. pombe* gezeigt wurde (Abb. 2.7. B (74, 245)). Die Fraktionierung eines Zellextrakts von *thi9*<sup>+</sup> exprimierenden Zellen bestätigte die membranständige Lokalisation von Thi9, was seine Funktion als Transportprotein bekräftigte (Abb. 2.7 C).

Die von Schweingruber et al. (225) isolierten *ptr1* Mutanten zeichnen sich durch Resistenz gegen das toxisch wirkende Thiaminanalogon Pyrithiamin und eine stark reduzierte Aufnahmeaktivität für Thiamin aus. Da sich ein *thi9Δ* Knockout bezüglich seiner Pyrithiaminresistenz identisch zur *ptr1* Mutante verhielt, bestätigte dies zum einen die Vermutung, dass Thi9 am Thiamintransport beteiligt ist bzw. selbst den gesuchten Thiamintransporter darstellt (Abb. 2.8 A). Andererseits sprach es dafür, dass der *ptr1* Locus mit *thi9*<sup>+</sup> allelisch ist und der Grund für die Pyrithiaminresistenz sowie das verminderte Transportvermögen der *ptr1* Mutanten eine Mutation ihres *thi9*<sup>+</sup> Allels ist. Beides konnte Cornelia Klein in ihrer Diplomarbeit bestätigen: Das Thi9 Protein des *ptr1* Stamms trägt eine Punktmutation im N-terminalen Bereich, dicht vor der ersten Transmembrandomäne. Der Aminosäureaustausch des konservierten Glutamts 81 zu Lysin und der damit verbundene Ladungsaustausch hat erhebliche Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins (Abb. 2.8 B, (121)).

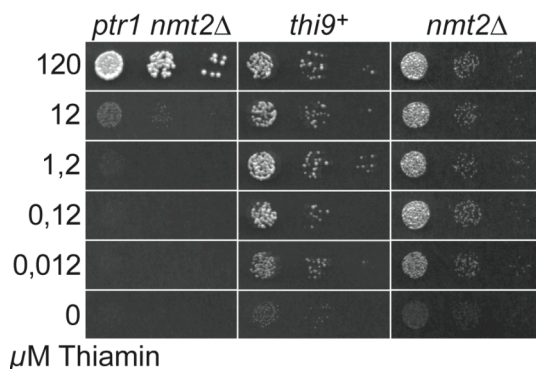




**Abb. 2.8. *ptr1*<sup>+</sup> ist allelisch mit *thi9*<sup>+</sup>.** (A) Je 10<sup>6</sup> Zellen von *S. pombe* FY254, *ptr1* und *thi9Δ::kanMX* wurden auf SD Platten ohne Thiamin ausgebracht, in deren Mitte ein Filterplättchen mit 20 μl Pyrithiamin (120 μM) aufgelegt wurde. Das Wachstum wurde nach drei Tagen bei 30°C dokumentiert. (B) Die C-terminale Thi9-GFP Fusion wurde mithilfe eines integrativen Plasmids in den *thi9*<sup>+</sup> Locus der *ptr1* Mutante integriert. Dies führt zur Verdoppelung des *thi9*<sup>+</sup> ORFs, wobei nur die erste Kopie, das *ptr1* Allel, mit GFP fusioniert wird und unter der Kontrolle des eigenen Promotors steht. Die zweite Kopie, das *thi9*<sup>+</sup> Wildtypallel, wird aufgrund einer fehlenden Promotorsequenz im 5'-Bereich nicht exprimiert. Der Kontrast wurde in der linken Hälfte der Abbildung verstärkt, um die exakte Lokalisation erkennbar zu machen (C. Klein, (121)).

#### II.C.4. Thi9 transportiert Thiamin

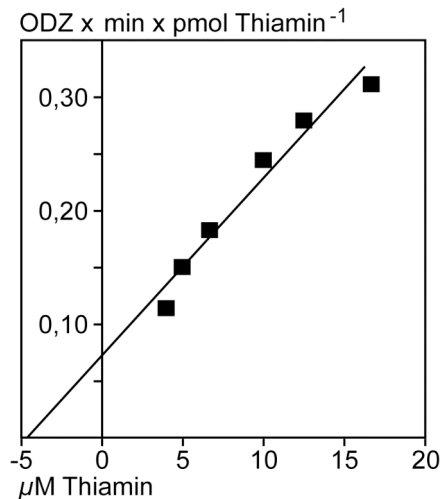
Eine *ptr1 nmt2Δ* Doppelmutante, in der sowohl Thiaminaufnahme als auch -biosynthese inhibiert sind, benötigte für optimales Wachstum 120 μM Thiamin, während die Ausgangsstämme *nmt2Δ* auf sehr viel geringeren Konzentrationen und *ptr1* erwartungsgemäß auch ohne Thiamin wachsen konnten (121). Durch Expression von *thi9*<sup>+</sup> wurde der starke Phänotyp der Doppelmutante vollständig geheilt. Die Zellen verhielten sich wie ein *nmt2Δ* Einzelknockout und waren in der Lage, bis zu einer Konzentration von 0,012 μM Thiamin zu wachsen (Abb. 2.9). Dies belegte zum einen noch einmal unabhängig, dass es sich bei *thi9*<sup>+</sup> um das Wildtyp-Allel des *ptr1-5* Locus handelte, zum anderen war es ebenso ein eindeutiger Hinweis darauf, dass Thi9 an der Versorgung der Zellen mit Thiamin beteiligt ist. Da der Pyridoxintransporter Bsu1 auch eine Transportaktivität für Thiamin besaß, wurden die nachfolgenden Experimente zur Charakterisierung von Thi9 in einem *bsu1Δ* Stamm durchgeführt. Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses und des Beitrags von Bsu1 auf die Thiaminaufnahme sind in II.C.5 dargestellt.



**Abb. 2.9. Thi9 vermittelt den Transport von Thiamin in *S. pombe*.** Das Wachstum von *ptr1 nmt2Δ::kanMX* Zellen, die ein leeres pREP3x Plasmid (*ptr1 nmt2Δ*) oder das Genbankplasmid pURSP1-*thi9*<sup>+</sup> (*thi9*<sup>+</sup>) enthielten, sowie das von *nmt2Δ::kanMX* Zellen wurde auf SD-Platten mit den angegebenen Thiaminkonzentrationen getestet. Die Platten wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert.

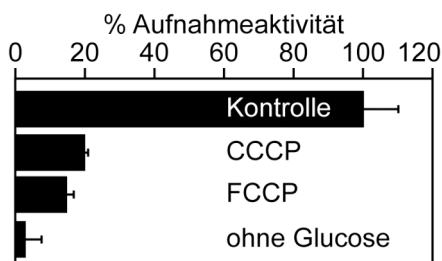
## II.C.5. Kinetische Charakterisierung von Thi9

Alle Aufnahmetests wurden in EMM durchgeführt, das 2% Glukose enthielt und einen pH-Wert von 3,8 besaß. Der  $K_m$ -Wert von Thi9 wurde in drei unabhängigen Experimenten, von denen eines in Abb. 2.10 dargestellt ist, bestimmt und betrug  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ .



**Abb. 2.10. Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von Thi9.** Die Transportaktivität für Thiamin wurde in *bsu1Δ* für verschiedene Substratkonzentrationen bestimmt. Die Messwerte eines Experimentes sind in Form eines Lineweaver-Burk-Diagramms dargestellt, aus dem sich ein  $K_m$ -Wert von  $0,2 \mu\text{M}$  berechnet. Das Experiment wurde zweimal unabhängig wiederholt.

Protonophoren, wie CCCP und FCCP, wirken entkoppelnd, indem sie den Protonengradienten und das Membranpotential über der Plasmamembran abbauen. Dadurch wird die Aktivität von  $\text{H}^+$ -Symportern stark beeinträchtigt, was auch bei Thi9 der Fall war. Hier verursachten die Entkoppler einen Rückgang der Transportrate um mehr als 80% (Abb. 2.11). Für Transportproteine, die Gradienten über der Plasmamembran für die Translokation ihres Substrats ausnutzen, ist der energetische Zustand der Zelle entscheidend. Die Gradienten werden durch primär-aktive Transportprozesse unter ATP-Verbrauch aufrechterhalten. So aktiviert Glukose direkt die Plasmamembran Protonen-ATPase, die ihrerseits ein elektrochemisches Potential (Protonengradient + Membranpotential) aufbaut. Der stimulierende Effekt von Glukose ist auch für den Thiamintransport entscheidend. Fehlt er, beträgt die Restaktivität der Thiaminaufnahme nur noch 5% (Abb. 2.11).

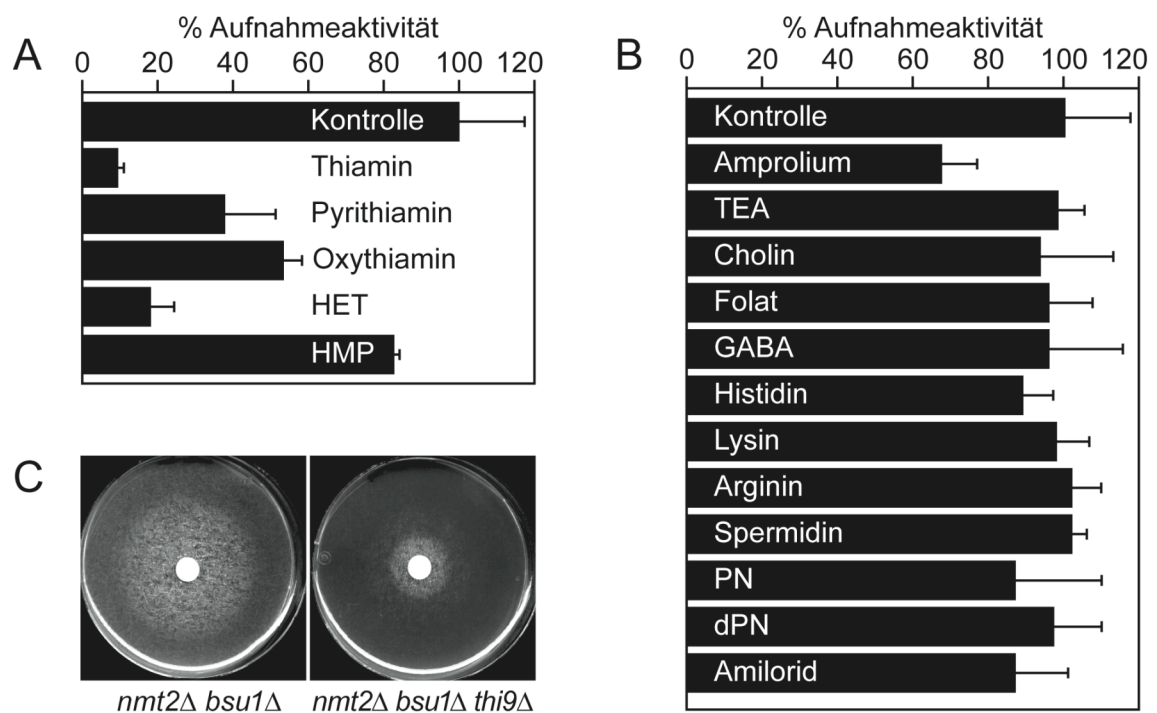


**Abb. 2.11. Die Thiaminaufnahme über Thi9 hängt von der Energetisierung und dem Protonengradienten ab.** Die Bestimmung der Aufnahmeaktivität erfolgte mit einer *bsu1Δ* Mutante, die in EMM angezogen und resuspendiert wurde. Drei Minuten nach Energetisierung der Zellen mit 1% Glukose wurden die Entkoppler CCCP und FCCP (je  $130 \mu\text{M}$ ) zugegeben. Der Einfluss von Glukose auf die Thiaminaufnahme wurde an *bsu1Δ* Zellen untersucht, die in EMM ohne Glukose resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert wurden. Der anschließende Test erfolgte ohne weitere Energetisierung.

Die Substratspezifität von Thi9 wurde in Gegenwart eines 10fach molaren Überschusses von Thiamin und analogen Substanzen untersucht. Daneben wurden auch basische Aminosäuren und positiv



geladene Verbindungen, wie Tetraethylammonium (TEA), Cholin und Spermidin getestet, da Thi9 schwach homolog zu den Plasmamembrantransportern dieser Verbindungen aus *S. cerevisiae* ist. Wie erwartet, senkt Thiamin die Transportrate um 90%, das strukturell sehr ähnliche Pyrithiamin und Oxythiamin um mehr als 50%. Amprolium, ein weiteres Thiaminanalogen, hatte keine Auswirkungen auf die Thiaminaufnahme (Strukturformeln siehe II.A.2, Abb. 2.1). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* scheint das Thiamintransportsystem in Spalthefe eine höhere Affinität für den Thiazolring als für die Pyrimidineinheit zu besitzen. Während die Anwesenheit von HET die Thiaminaufnahme um mehr als 80% inhibiert, haben HMP und die Pyridin-Heterozyklen Pyridoxin, 4-Desoxy-Pyridoxin und Amilorid keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität (Abb. 2.12 A, B).



**Abb. 2.12. Thi9 ist ein spezifischer Transporter für Thiamin und HET.** (A, B) Aufnahme von [ $^3$ H]Thiamin in *bsu1Δ* in An- oder Abwesenheit eines 10fach molaren Überschusses der angegebenen Verbindungen. (C) *nmt2Δ bsu1Δ* und *nmt2Δ bsu1Δ thi9Δ* Zellen wurden in EMM ohne Thiamin verarmt, bevor  $10^6$  Zellen auf SD Platten ohne Thiamin ausgebracht wurden. Ein Filterplättchen mit 20  $\mu$ l einer 1,2  $\mu$ M HET-Lösung wurde in der Mitte aufgelegt und die Platten für drei Tage bei 30°C inkubiert.

Der Grund der HET-Spezifität liegt nicht alleine an der positiven Ladung des Thiazolrings, da positiv-geladene Verbindungen wie Tetraethylammonium oder Spermidin die Aufnahme nicht beeinflussen. Außerdem konnte die Homologie von Thi9 zu Transportern für Cholin, GABA oder die basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin auf biochemischer Ebene nicht bestätigt werden. Die menschlichen Thiamintransporter ThTr-1 und ThTr-2 besitzen eine hohe Ähnlichkeit zum menschlichen Folattransporter RFC. Da dieser neben Folat auch Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat transportieren kann, wurde auch Folsäure als Kompetitor eingesetzt. Allerdings war sie nicht der Lage, die Thi9-vermittelte Thiaminaufnahme zu inhibieren (Abb. 2.12 B).

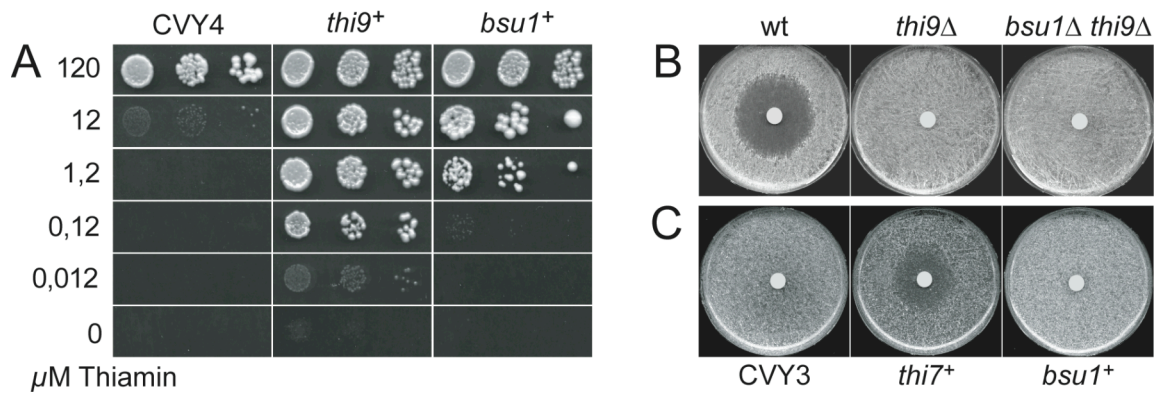
Dem starken Effekt von HET wurde durch Wachstumstests genauer nachgegangen. Falls HET tatsächlich von Thi9 transportiert wird, sollte ein *nmt2Δ* Stamm mit defekter HET-Biosynthese nicht nur durch die Gabe von Thiamin, sondern auch durch HET komplementiert werden können. In der Tat zeigten *nmt2Δ bsu1Δ* Zellen eine 2,5fach größere Wachstumszone um ein mit HET getränktes Filterplättchen als eine *nmt2Δ bsu1Δ thi9Δ* Mutante (Abb. 2.12 C)

Als Ergebnis ist festzustellen, dass Thi9 durch die Aufnahmetests als hochaffiner Thiamintransporter charakterisiert werden konnte. Seine Substratspezifität ist begrenzt auf Thiamin, HET und strukturanaloge Verbindungen. Die Aufnahme von Thiamin erfolgt durch Protonensymport.

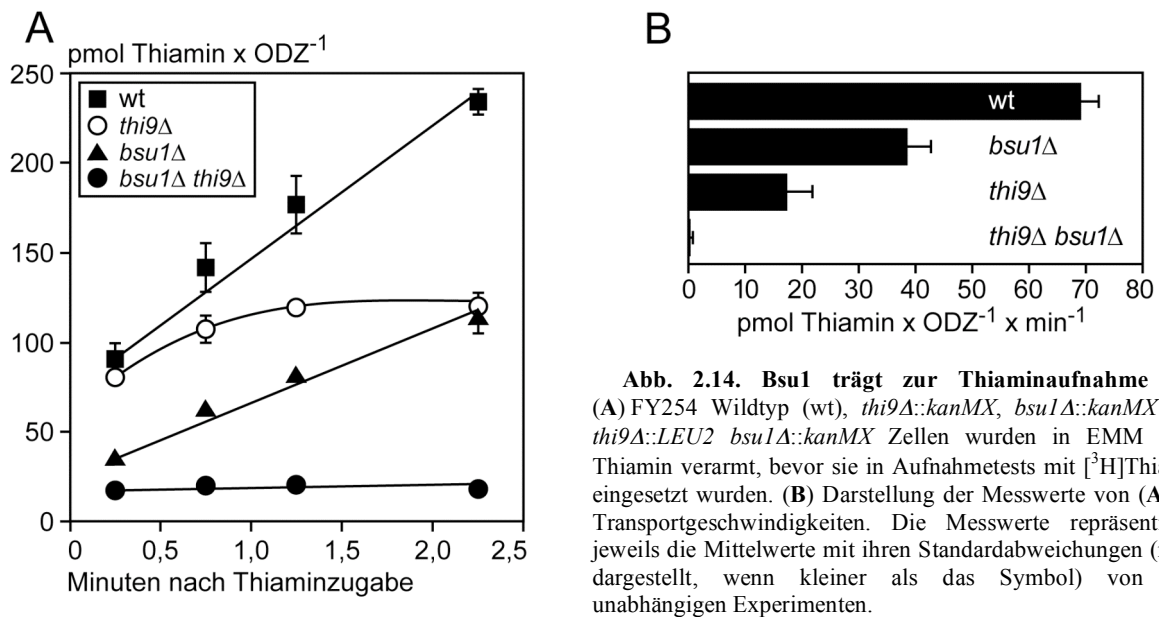
## **II.C.6. Der Pyridoxintransporter Bsu1 transportiert ebenfalls Thiamin**

Erste Aufnahmetests mit einem *thi9Δ* Stamm lieferten Hinweise darauf, dass es in *S. pombe* neben Thi9 noch einen weiteren Mechanismus zur Aufnahme von Thiamin geben muss. Die Transportaktivität wurde unerwarteter Weise nur um 75% erniedrigt und die verbleibende Aktivität konnte durch den Protonophoren CCCP vollständig unterbunden werden, was für einen Transport durch  $H^+$ -Symport sprach (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft und des Zusammenspiels der Biosynthesewege von Pyridoxin und Thiamin wurde untersucht, ob letzteres auch ein Substrat von Bsu1 darstellt. Bsu1 wurde von Stolz et al. (245) als Pyridoxin/ $H^+$ -Symporter charakterisiert, dessen Expression durch Thiamin reguliert wird. In der Tat verhalf die Überexpression von *bsu1<sup>+</sup>* der CVY4 Mutante, bis zu einer Konzentration von 1,2  $\mu$ M Thiamin zu wachsen. Damit war die Komplementation allerdings rund 10-100fach schwächer als durch *thi9<sup>+</sup>*, dessen Expression noch sehr gutes Wachstum auf 0,12  $\mu$ M und schwaches Wachstum auf 0,012  $\mu$ M vermittelte (Abb. 2.13 A). Im Gegensatz zu Thi9 besaß Bsu1 jedoch keine nachweisbare Transportaktivität für Pyrithiamin. *thi9Δ* Mutanten waren bereits vollständig resistent gegenüber dem toxischen Analogon und selbst bei sehr hohen Konzentrationen führte die zusätzliche Deletion von *bsu1<sup>+</sup>* in *thi9Δ* Zellen nicht zu einer Verstärkung der Pyrithiaminresistenz (Abb. 2.13 B). Auch die heterologe Überexpression von *bsu1<sup>+</sup>* in der transportdefizienten Bäckerhefemutante CVY3 führte – anders als *thi9<sup>+</sup>* – nicht zur Sensitivität gegenüber Pyrithiamin (Abb. 2.13 C).

Die Aktivität von Bsu1 bei der Thiaminaufnahme wurde auch in Aufnahmetests sichtbar. *S. pombe* Wildtypzellen besaßen eine lineare Kinetik, die bereits zu Beginn der Messung hohe Werte aufwies. Auch die *thi9Δ* Mutante zeigte dieses hohe Grundniveau, welches über die Zeit allerdings nur noch geringfügig weiter anstieg. Im Gegensatz dazu war die Transportaktivität in *bsu1Δ* linear und begann bei einem niedrigeren Ausgangsniveau. Rechnerisch setzt sich die Aktivität des Wildtyps auch als Summe der Beiträge von Bsu1 und Thi9 zusammen. Fehlen beide Proteine (*bsu1Δ thi9Δ*), ist keinerlei Aufnahme von Thiamin nachweisbar (Abb. 2.14).



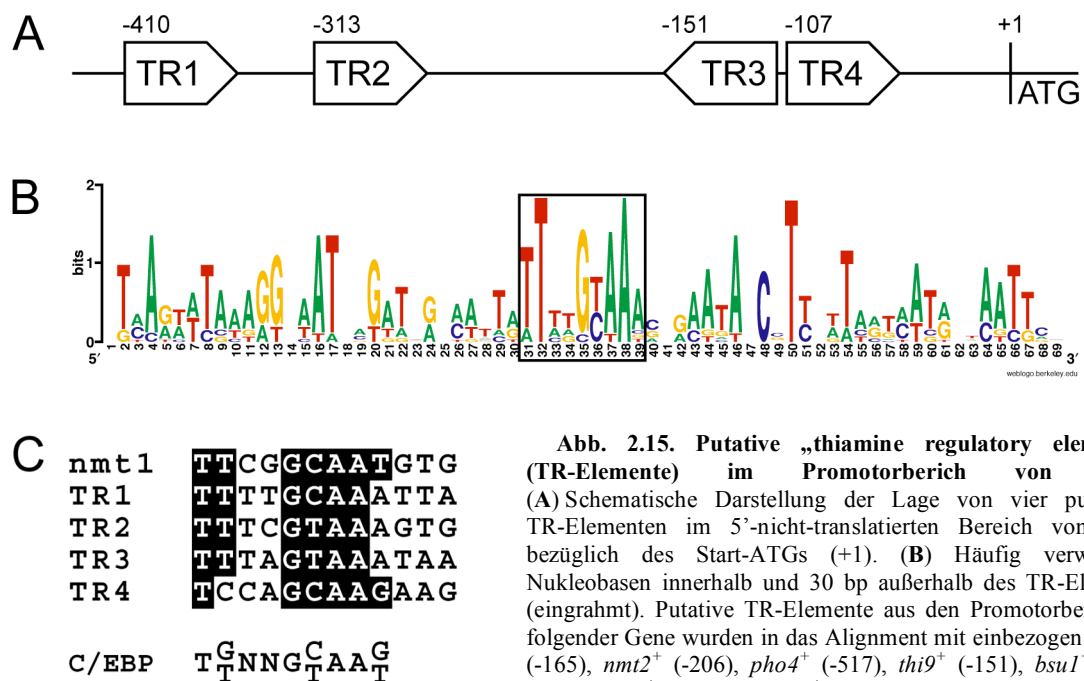
**Abb. 2.13. Bsu1 vermittelt den Transport von Thiamin aber nicht von Pyrithiamin.** (A) Das Wachstum von CVY4, transformiert mit einem leeren pFL61 Plasmid (CVY4) oder den Plasmiden pFL61-*thi9*<sup>+</sup> (*thi9*<sup>+</sup>) bzw. p426TDH-*bsu1*<sup>+</sup> (*bsu1*<sup>+</sup>) wurde auf SD Platten mit angegebenen Thiaminkonzentrationen getestet. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. (B) Pyrithiaminresistenz von FY254 Wildtyp (wt), *thi9Δ::kanMX* und *bsu1Δ::kanMX thi9Δ::LEU2* wurden auf SD Platten ohne Thiamin ausgebracht, (C) Die transportdefiziente Mutante CVY3, transformiert mit einem leeren pFL61 Plasmid (CVY3) bzw. mit den Überexpressionsplasmiden pFL61-*thi7*<sup>+</sup> (*thi7*<sup>+</sup>) oder p426TDH-*bsu1*<sup>+</sup> (*bsu1*<sup>+</sup>) wurde auf ihre Pyrithiaminsensitivität getestet. (B, C) Je 10<sup>6</sup> Zellen wurden auf SD Platten ohne Thiamin ausgebracht, auf die ein Filterplättchen mit 20 µl Pyrithiamin (120 µM) gelegt wurde. Die Platten wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert.



*S. pombe* verfügt also mit Thi9 und Bsu1 über zwei unabhängige Wege, Thiamin aufzunehmen. Aufgrund des höheren Beitrags zum Thiamintransport und der höheren Aktivität wird Thi9 als der Haupttransporter angesehen.

## II.C.7. Die Expression von *thi9*<sup>+</sup> wird durch Thiamin reguliert

Thiamin reguliert die Expression von vielen Genen, die an seiner Biosynthese oder am Transport beteiligt sind. Auch im Promotorbereich von *thi9*<sup>+</sup> lassen sich vier putative „thiamine regulatory elements“ (TR-Elemente) in beiden Orientierungen finden. Sie stimmen größtenteils mit der Konsensussequenz überein, wie sie in den 5'-Bereichen aller bisher identifizierten, thiaminabhängig regulierten Genen in *S. pombe* enthalten sind (Abb. 2.15). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Thiamin die Expression von *thi9*<sup>+</sup> beeinflusst.

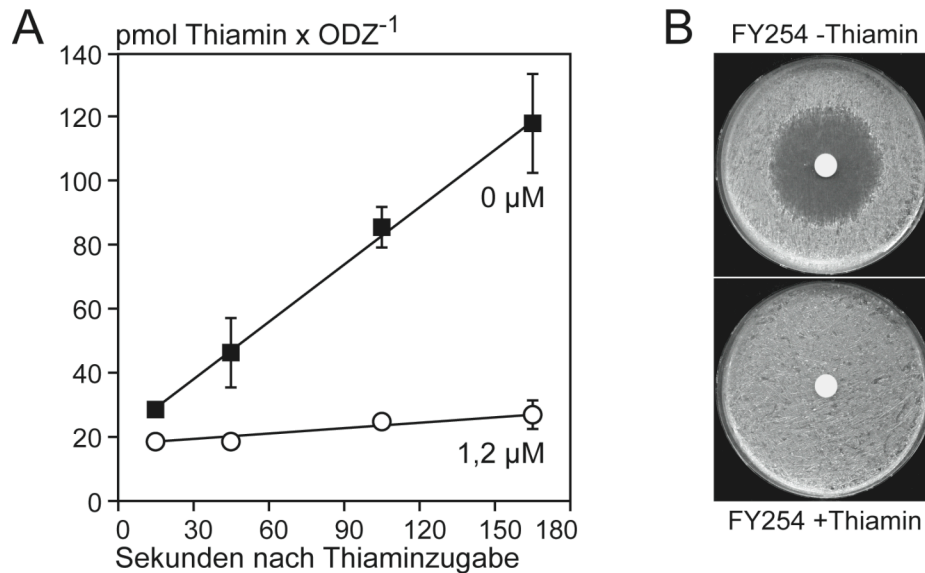


**Abb. 2.15. Putative „thiamine regulatory elements“ (TR-Elemente) im Promotorbereich von *thi9*<sup>+</sup>.** (A) Schematische Darstellung der Lage von vier putativen TR-Elementen im 5'-nicht-translatierten Bereich von *thi9*<sup>+</sup> bezüglich des Start-ATGs (+1). (B) Häufig verwendete Nukleobasen innerhalb und 30 bp außerhalb des TR-Elements (eingrahmt). Putative TR-Elemente aus den Promotorbereichen folgender Gene wurden in das Alignment mit einbezogen: *nmt1*<sup>+</sup> (-165), *nmt2*<sup>+</sup> (-206), *pho4*<sup>+</sup> (-517), *thi9*<sup>+</sup> (-151), *bsu1*<sup>+</sup> (-306 rev), *mfm2*<sup>+</sup> (-111), *anc1*<sup>+</sup> (-186), SPBC530.07c (-327), SPBP8B7.18c (-225 rev), SPCC162.03 (-198), SPBC1604.04

(-327 rev), SPCC794 (-301 rev); (Position bezüglich des Start-ATGs, rev: in 3'→5'-Orientierung auf komplementärem Strang) (C) Alignment der putativen TR-Elemente aus dem Promotorbereich von *thi9*<sup>+</sup> mit dem identifizierten TR-Element, das für die thiaminabhängige Regulation von *nmt1*<sup>+</sup> essentiell ist. Alle Elemente enthalten die Konsensussequenz einer möglichen Bindestelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP aus Säuger (297).

Um die Auswirkung von Thiamin auf die Aufnahmeaktivität von Thi9 zu untersuchen, wurden *bsu1Δ* Zellen über drei Tage hinweg täglich in frischem EMM ohne Thiamin angezogen, um ihren intrazellulären Thiaminvorrat zu erschöpfen. Parallel dazu wurde der Stamm in EMM mit 1,2 μM Thiamin kultiviert. Aufnahmetests mit [<sup>3</sup>H]Thiamin zeigten, dass die Transportaktivität von Zellen, die in Gegenwart von Thiamin angezogen wurden, stark vermindert war. Das bestätigte frühere Messungen von Schweingruber et al. (225). Die Transportrate der reprimierten Zellen betrug mit  $3,8 \pm 1,1 \text{ pmol} \times \text{OD}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  nur rund 10% der Geschwindigkeit von thiaminverarmten Zellen ( $35,3 \pm 4,0 \text{ pmol} \times \text{OD}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ). Allerdings wurde die Aufnahme nicht vollständig unterdrückt, eine schwache Restaktivität blieb bestehen (Abb. 2.16 A).

Einen weiteren Hinweis für die Regulation der Thiaminaufnahme durch Thiamin lieferten Untersuchungen zur Pyrithiaminresistenz in FY254 Wildtypzellen. Während in Abwesenheit von Thiamin die Sensitivität durch einen Hemmhof sichtbar war, hatte Pyrithiamin auf Platten, die 1,2  $\mu\text{M}$  Thiamin enthielten, keinen toxischen Effekt auf die Zellen (Abb. 2.16 B).

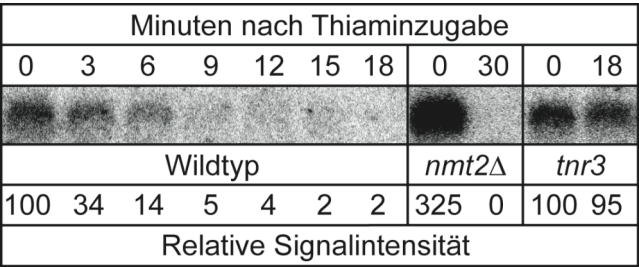


**Abb. 2.16. Thiamin reguliert die Aktivität seines Transporters.** (A) FY254 *bsu1Δ* wurde zur Thiaminverarmung drei Tage jeweils in frisches EMM ohne Thiamin überimpft. Anschließend wurden die Zellen in EMM ohne bzw. mit 1,2  $\mu\text{M}$  Thiamin angezogen und in Aufnahmetests eingesetzt. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen (nicht dargestellt, wenn kleiner als das Symbol) von drei unabhängigen Experimenten. (B) Je  $10^6$  Zellen von FY254 Wildtyp wurden auf SD Platten ohne bzw. mit 1,2  $\mu\text{M}$  Thiamin ausgebracht, auf die ein Filterplättchen mit 20  $\mu\text{l}$  Pyrithiamin (120  $\mu\text{M}$ ) gelegt wurde. Die Platten wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert.

Sowohl der Rückgang der Transportaktivität als auch die Pyrithiaminresistenz in Gegenwart von Thiamin ließe sich durch die Inaktivierung des Thi9 Proteins oder die Inhibierung seiner Expression erklären. Northern Blot Analysen sollten darüber Auskunft geben, ob diese Beobachtungen mit der Expression von *thi9*<sup>+</sup> zusammenhängen. Dazu wurden FY254 Wildtyp, *tnr3-5* und *nmt2Δ* in EMM ohne bzw. mit 8 nM (*nmt2Δ*) Thiamin vorkultiviert, um die Zellen an Thiamin zu verarmen und zu dereprimieren. Die Zugabe von 1,2  $\mu\text{M}$  Thiamin zu den Hauptkulturen führte zur Repression thiaminregulierter Gene. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die daraus isolierte RNA einer Northern Blot Analyse unterzogen.

In Abwesenheit von Thiamin war eine starke Expression von *thi9*<sup>+</sup> im Wildtyp zu beobachten. Mit einer äußerst kurzen Halbwertszeit nahm sie bereits drei Minuten nach Zugabe von Thiamin um fast 70% ab und hatte nach 15 Minuten ein konstantes Expressionsniveau von rund 2% erreicht (Abb. 2.17). In *nmt2Δ* Mutanten war eine sehr starke Induktion der *thi9*<sup>+</sup>-Genexpression zu beobachten. Verglichen mit dem Wildtyp war *thi9*<sup>+</sup> in Thiaminmangel um das 3fache hochreguliert und unterlag ebenfalls der Repression durch Thiamin. Anders verhielt es sich bei den von Schweingruber et al. (226) isolierten *tnr3-5* Mutanten. Durch die fehlende Aktivität der

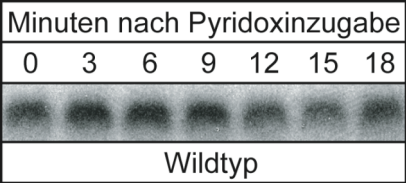
Thiaminpyrophosphatkinase findet keine Repression thiaminregulierter Gene statt (61). Gleiches war ebenso für *thi9<sup>+</sup>* zu beobachten, dessen Expressionsniveau sich auch durch Zugabe von 1,2 µM Thiamin nicht veränderte (Abb. 2.17).



**Abb. 2.17. Thiamin reprimiert die Transkription von *thi9<sup>+</sup>*.** *S. pombe* Wildtyp und *tnr3* wurden zur Verarmung über drei Tage in frischem EMM ohne Thiamin, *nmt2Δ* in EMM mit 8 nM Thiamin angezogen. Nach zwei Stunden Wachstum wurden die Hauptkulturen mit 1,2 µM Thiamin versetzt. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots für die RNA Isolierung entnommen. Die RNA (10 µg/Spur) wurde auf Formaldehyd-Gelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose Membranen übertragen und mit einer radioaktiven

Sonde, die die ganze Sequenz des *thi9<sup>+</sup>* Gens enthielt, hybridisiert. Die Signale wurden mithilfe des PhosphorImagers quantifiziert und auf die Signale von *act1<sup>+</sup>* (Actin) normalisiert. Die prozentualen Signalintensitäten von *nmt2Δ* beziehen sich auf die Signalstärke des 0 min-Wertes des Wildtyps.

Das strukturelle Grundgerüst der Pyrimidineinheit von Thiamin ist Pyridoxin. Da die Expression des Pyridoxintransporters Bsu1 – neben Pyridoxin – auch der Kontrolle durch Thiamin unterliegt (245), wurde ein Einfluss von Pyridoxin auf die Expression von *thi9<sup>+</sup>* untersucht. Die Menge der *thi9<sup>+</sup>* mRNA blieb nach Zugabe von 2 µM Pyridoxin über eine Zeitspanne von 18 Minuten unverändert (Abb. 2.18). Selbst eine 10fach höhere Konzentration (20 µM) hatte nach 90 min keinen reprimierenden Effekt auf die Genexpression von *thi9<sup>+</sup>* (Daten nicht gezeigt).



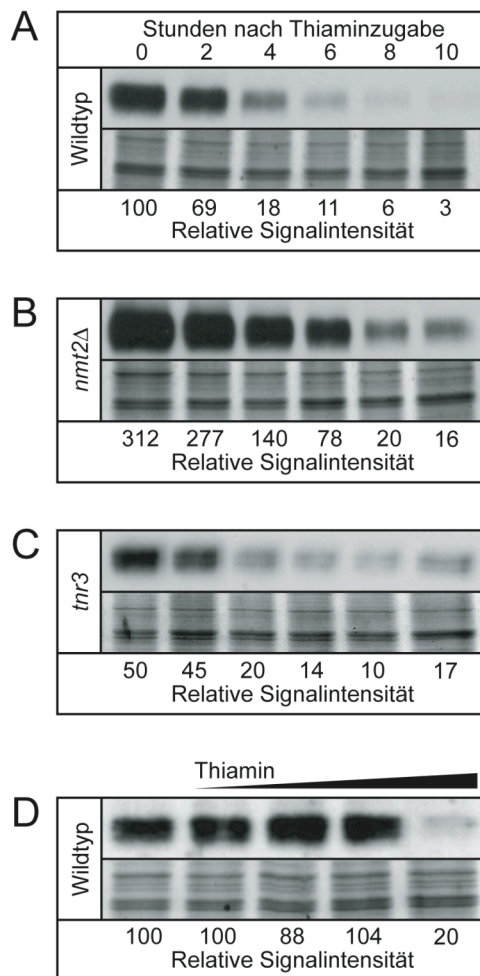
**Abb. 2.18. Pyridoxin besitzt keinen reprimierenden Effekt auf die Expression von *thi9<sup>+</sup>*.** Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in Abb. 2.16 beschrieben, nur dass die Repression mit 2 µM Pyridoxin anstatt mit Thiamin getestet wurde.

Der Effekt von Thiamin auf die Transkription von *thi9<sup>+</sup>* wurde durch die genomische Integration einer C-terminal Epitop-markierten Version von Thi9 (Thi9-3HA) in Wildtyp, *nmt2Δ*, *ptr1* und *tnr3* Zellen auch auf Proteinebene untersucht. Die Stämme wurden zur Verarmung über drei Tage in EMM ohne Thiamin angezogen. Nach Überführung in EMM mit 1,2 µM Thiamin wurde aus stündlich entnommenen Proben die Membranfraktion isoliert und die Menge an vorhandenem Thi9 Protein durch Western Blot Analyse quantifiziert. Im Wildtyp war eine starke Expression von *thi9<sup>+</sup>* sichtbar, die nach Thiaminzugabe kontinuierlich abnahm. Die Halbwertszeit betrug rund zwei Stunden, was der Dauer einer Zellteilung unter diesen Bedingungen entsprach (Abb. 2.19 A). In *nmt2Δ* Zellen war die Menge an Thi9 Protein im Vergleich zum Wildtyp rund 3fach erhöht, was sehr gut mit der Menge an *thi9<sup>+</sup>* mRNA korrelierte (Abb. 2.17). Im Gegensatz zum Wildtyp jedoch waren nach zehn Stunden immer noch 16% des Thi9 Proteins vorhanden, was die langsamere Generationszeit widerspiegelte (Abb. 2.19 B). *tnr3* Mutanten verfügen über eine defekte Thiamindiphosphatkinase und zeichnen sich,



wie im Northern Blot gezeigt, durch konstitutive Expression thiaminregulierter Gene aus (Abb. 2.17). Entgegen dieser Erwartung war jedoch einerseits die Menge an Thi9 Protein geringer als in Wildtypzellen, andererseits war auch in der *tnr3* Mutante ein Rückgang von Thi9 zu sehen (Abb. 2.19 C).

Externes Thiamin ist somit ein sehr effektiver Regulator seines Transportsystems, weil es innerhalb von Minuten die Transkription von *thi9*<sup>+</sup> unterbindet. Das vorhandene Thi9 Protein scheint nicht aktiv abgebaut oder inaktiviert, sondern mit der Zellteilung ausverdünnt zu werden.



**Abb. 2.19. Der Effekt von Thiamin auf das Protein Thi9.** FY254 Wildtyp, *nmt2Δ* und *tnr3* exprimierten eine 3HA-markierte Version von *thi9*<sup>+</sup>. Die Zellen wurden zur Thiamin-Verarmung über drei Tage in jeweils frischem EMM ohne Thiamin bzw. mit 8 nM Thiamin im Fall von *nmt2Δ* angezogen, bevor sie für die nachfolgenden Tests verwendet wurden. (A-C) Die Hauptkulturen von Wildtyp, *nmt2Δ* und *tnr3* wurden nach zwei Stunden Wachstum mit 1,2 μM Thiamin versetzt. Zehn Stunden lang wurden alle zwei Stunden 10 OD Zellen geerntet. Die daraus isolierte Membranfraktion wurde in zwei parallelen Ansätzen durch SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt. Das eine Gel wurde weiter durch Western Blot mit einem monoklonalem anti-HA Antikörper (sc-7392) analysiert (oberer Teil), das andere, Coomassie-gefärbte Gel diente als Beladungskontrolle (unterer Teil). (D) Wildtyp Zellen mit genomisch integriertem *thi9*-3HA wurden für 12 Stunden in EMM ohne bzw. mit 0,0012, 0,012, 0,12, 1,2 μM angezogen. 10 OD Zellen wurden wie in (A-C) beschrieben weiter analysiert. Die Intensität der Banden wurde mithilfe der Software MultiAnalyst quantifiziert und beruht in (A-C) auf einem schwächer exponierten Blot, bei dem Unterschiede in der Signalstärke gerade zu Beginn des Experiments deutlicher zu sehen waren.

Um die Repression von Thi9 in Abhängigkeit von der Thiaminkonzentration zu untersuchen, wurden Thi9-3HA Wildtypzellen in EMM ohne bzw. versetzt mit 0,0012, 0,012, 0,12 oder 1,2 μM Thiamin für 24 Stunden angezogen und die isolierte Membranfraktion einer Western Blot Analyse unterzogen. Während Konzentrationen bis 0,12 μM die Menge an Thi9 nicht beeinflussten, verursachte die Zugabe von 1,2 μM Thiamin einen deutlichen Rückgang der Proteinmenge um mindestens 80% (Abb. 2.19 D). Die verbleibende Proteinmenge ist vermutlich für die Restaktivität verantwortlich, die in reprimierten *bsu1Δ* Zellen gemessen wurde und damit von Thi9 stammen muss (Abb. 2.16 A).

## II.D. Diskussion

### II.D.1. Der Verlust der Thiaminbiosynthese als evolutionärer Vorteil

Thiamindiphosphat (TDP), die katalytisch aktive Form von Vitamin B<sub>1</sub>, ist ein essentieller Cofaktor für die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxosäuren sowie für die Übertragung von C<sub>2</sub>-Einheiten im Rahmen des Pentosephosphatwegs. Während Mikroorganismen Thiamin *de novo* synthetisieren können, haben manche Algen, Pflanzen sowie die Klasse der Säugetiere diese Fähigkeit im Laufe der Evolution verloren und sind deshalb auf die Aufnahme von Thiamin mit der Nahrung angewiesen. Innerhalb der Gruppe der Algen, die lange Zeit als prototrophe Organismen angesehen wurden, benötigen manche Arten entweder die Vorstufen HET bzw. HMP oder Thiamin selbst als essentielle Wachstumsfaktoren (146).

Der Biosyntheseweg für Thiamin wurde evolutionsgeschichtlich an unterschiedlichen Stellen und unabhängig voneinander durch den Verlust eines oder mehrerer Biosynthesegene unterbrochen. Dies trifft nicht nur für Thiamin, sondern für die meisten Vitamine zu, zu deren Synthese höhere Lebewesen nicht mehr in der Lage sind. Die fehlende Fähigkeit, Vitamine herstellen zu können, scheint nur auf den ersten Blick ein Nachteil für einen Organismus zu sein. Vitamine werden nur in kleinsten Mengen benötigt und ihre Biosynthese erfolgt meist durch einen mehrstufigen und zudem energieaufwendigen Reaktionsweg. Der Verlust der Biosynthese bedeutete also die Einsparung von Ressourcen aber nicht gleichzeitig den Verzicht auf Thiamin bzw. auf die nach wie vor notwendigen Vitamine. Die meisten Lebewesen, selbst diejenigen, die zur Biosynthese fähig sind, entwickelten parallel dazu spezifische und hoch-affine Aufnahmesysteme für die jeweiligen Vitamine. Damit vermeiden sie nicht nur eine Unterversorgung, sondern sie sparen die für die Biosynthese benötigte Energie sowie Metabolite. Der Energieaufwand beschränkt sich dabei nicht nur auf die Vitaminbiosynthese selbst. Die Thiaminbiosynthesegene *nmt1*<sup>+</sup> in *S. pombe* sowie *THI4* und die *THI5*-Familie in *S. cerevisiae* beispielsweise gehören bei Thiaminmangel zu den am stärksten exprimierten Genen (160, 181). In *Neurospora crassa* stellt Thi4 1,5% des Proteoms während der exponentiellen Wachstumsphase dar (62). Das bedeutet, dass zunächst sehr viel Energie alleine für die Herstellung der Biosyntheseenzyme aufgewendet werden muss. Das erklärt auch, wieso bei Anwesenheit von Thiamin seine Biosynthese inhibiert wird und die Versorgung der Zellen hauptsächlich durch die Aufnahme geschieht. Der Wachstumsvorteil, den die Verwertung von externem Thiamin darstellt, macht sich beispielweise in einer kürzeren Generationszeit bemerkbar (201). Auch am Beispiel von Pyridoxin (Vitamin B<sub>6</sub>) wird der Beitrag des Transports deutlich. Während transportdefiziente Hefezellen im Vergleich zum Wildtyp lediglich 8% des Cofaktors Pyridoxalphosphat (PLP) besaßen, hatte der Verlust der Biosynthese nahezu keine Auswirkung auf den PLP-Gehalt in den Zellen (111).



In einem Habitat, das ausreichende Mengen des Vitamins bot, war die Akkumulation von Biosynthesedefekten also keineswegs ein defizitärer Zweig der Evolution. Sie stellte vielmehr einen selektiven Vorteil dar, da die eingesparte Energie für andere wichtige endogene Prozesse eingesetzt werden konnte (42).

## **II.D.2. Transportsysteme für Thiamin entwickelten sich mehrmals unabhängig**

Es ist bemerkenswert, dass sich die Fähigkeit, Thiamin aus der Umgebung aufzunehmen, während der Evolution mehrmals unabhängig voneinander entwickelte, wie es auch im Fall der Transportproteine für Riboflavin in Kapitel I dargestellt wurde. Selbst innerhalb der Bakterien lassen sich verschiedene Typen möglicher Thiamintransporter finden, die durch konservierte regulatorische Elemente in ihren 5'-Bereichen identifiziert wurden. Das bakterielle Transportprotein ThiBPQ (aus *Salmonella typhimurium*) und sein putatives Homologes ThiXYZ (aus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien, der Gruppe *Bacillus/Clostridium* und Thermotogales), welches vermutlich die Aufnahme von Hydroxymethylpyrimidin (HMP) katalysiert, nutzen die Hydrolyse von ATP, um ihr Substrat aktiv in die Zelle zu schleusen. Daneben kodieren *yuaJ*, *cytX* und *pnuT* für weitere mögliche bakterielle Thiamintransporter, deren genauer Mechanismus ebenso wie ihre Substratspezifität aber noch ungeklärt ist (214, 276).

Thi9 besitzt weder Ähnlichkeit zu diesen bakteriellen, noch zu den charakterisierten menschlichen Thiamintransportern ThTr-1 und ThTr-2 bzw. zu Thi7 aus *S. cerevisiae* und stellt damit den ersten Vertreter einer neuen Klasse von Thiamintransportern dar. Da sich die Linien der Hemiascomyceten (*S. cerevisiae*) und der Archiascomyceten (*S. pombe*) bereits vor rund 330 Millionen Jahren getrennt haben, sind die Spezies *S. cerevisiae* und *S. pombe* phylogenetisch nur sehr entfernt miteinander verwandt (233). Ihre Entwicklung verlief seit der Trennung unabhängig voneinander, was sich in der konvergenten Evolution unterschiedlicher Transportproteine zu analogen Proteinen äußert. Ein Beispiel dafür sind auch die Pyridoxintransporter Tpn1 (*S. cerevisiae*) und Bsu1 (*S. pombe*), die keine Gemeinsamkeit auf Proteinebene, jedoch eine ähnliche Substratspezifität besitzen (244, 245). Während Tpn1 zur Familie der Purin-Cytosin Transporter innerhalb der Major Facilitator Superfamily gehört, ist Bsu1 ein Mitglied der „Plasmamembrane Drug/Proton Antiporter“ innerhalb der Multi-Drug Resistance Family. Proteine mit guter Homologie zu Thi9 lassen sich in anderen Ascomyceten, wie *S. japonicus*, *A. fumigatus*, *Yarrowia lipolytica* oder *C. neoformans* finden, von denen jedoch keines funktionell charakterisiert ist. Vorhersagen über ihre Funktion beruhen auf der Ähnlichkeit zu bekannten Transportern für GABA, Cholin, Polyamine oder basischen Aminosäuren aus *S. cerevisiae*. Sie gehören zur ACT Familie (amino acid/choline transporter) innerhalb der APC (amino acid/polyamine/organocation) Superfamilie (TC 2.A.3.4, (100)), zu der auch Thi9 gezählt wird, und zwar trotz der teilweise nur geringen Identität von 20 bis 25%. Da die

jeweiligen Organismen auch Thi7-Homologe besitzen, ist meist unklar, welches der beiden Proteine jeweils die Aufnahme von Thiamin vermitteln könnte. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass in Organismen mit besseren Thi9- als Thi7-Orthologen tatsächlich Thi9 als Thiamintransporter wirkt.

Die verantwortlichen Transportproteine für Thiamin sind bislang nur für *S. cerevisiae*, für den Menschen und nun auch für *S. pombe* bekannt. Dabei fällt auf, dass sich sowohl im Genom der Bäckerhefe als auch menschlichen Genom mehr als ein Gen finden lässt, dessen Genprodukt entweder eine hohe Homologie zum Thiamintransporter besitzt oder das selbst für einen Thiamintransporter kodiert. Während allerdings die Thi7-Homologen Thi71, das kürzlich als hoch-affiner Transporter Nrt1 für Nikotinamidribosid identifiziert wurde (15), und Thi72 in Bäckerhefe nur im überexprimierten Zustand den Wachstumsdefekt einer *thi7Δ* Mutante heilen können, tragen beide menschlichen Transporter – ThTr-1 und ThTr-2 – zur Thiaminaufnahme bei. Ihre funktionelle Redundanz ist der Grund, wieso eine Mutation in einem der Transportergene nicht zu Thiaminunterversorgung und damit zur Erkrankung an Beriberi führt.

Auch *S. pombe* stellt in diesem Zusammenhang keine Ausnahme dar. Der ORFs SPCC794.03 kodiert für ein putatives Membranproteinprotein mit zwölf TMDs, das zu 47% mit Thi9 identisch ist und in einer Stammbaumanalyse den Thi9-Homologen anderer Organismen zugeordnet wird. Da die Expression seines Gens ebenfalls der Kontrolle durch Thiamin unterliegt (103), besteht die Wahrscheinlichkeit, dass ihm eine Rolle im Thiaminmetabolismus zukommt. Unter der Voraussetzung, dass SPCC794.03 ein funktionelles Protein kodiert, scheint dieses jedoch nicht Thiamin oder Pyrithiamin zu transportieren, da eine *thi9Δ bsu1Δ* keinerlei Aufnahmeaktivität für Thiamin besaß und die Deletion von *thi9*<sup>+</sup> ausreichte, um Resistenz gegen Pyrithiamin zu vermitteln (Abb. 2.13 B, 2.14 B).

Neben Thi9 besitzt *S. pombe* mit Bsu1 eine weitere Möglichkeit, Thiamin aus der Umgebung aufzunehmen. Obwohl das als Pyridoxintransporter charakterisierte Protein Bsu1 mit einer Aminosäureidentität von 16,2% nur schwach homolog zu Thi9 ist, hat es – wie Thi9 – Ähnlichkeiten zu Transportproteinen, deren Substrate positiv geladene Verbindungen sind. Dazu zählt ein putativer Polyamin-Transporter aus *C. neoformans* (31% Identität) sowie ein Mitglied der Familie der Spermidintransporter aus *S. pombe* (26% Identität). Die Fähigkeit von Bsu1, Thiamin zu transportieren, ist außerdem weniger überraschend, wenn man die Interaktion der beiden Biosynthesewege bedenkt. Pyridoxin stellt die Vorstufe der HMP-Einheit dar und besitzt somit eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu einem Teil des Thiaminmoleküls.

Die Entwicklung der Thiamintransporter scheint demnach im Laufe der Evolution mehrmals unabhängig voneinander stattgefunden und, obwohl sie getrennt verlief, in den bislang untersuchten Organismen zumindest zu zwei sehr homologen Proteinen geführt zu haben.

## II.D.3 Thiamintransport in *S. pombe*

Thi9 ist ein hoch-affiner Thiamintransporter mit einem  $K_m$ -Wert von  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , der sein Substrat energieabhängig durch Protonensymport in die Zellen transportiert. Die Thiaminaufnahme wird durch Analoga wie Pyrithiamin oder Oxythiamin inhibiert. Obwohl Thi9 Ähnlichkeit zu Permeasen für basische Aminosäuren, Cholin oder GABA besitzt, hatte die Anwesenheit von basischen Aminosäuren oder positiv geladenen Verbindungen keine Auswirkung auf die Aufnahme von Thiamin (Abb. 2.12). Die Fähigkeit zur Thiaminaufnahme ist demnach nicht mehr nur die Nebenaktivität einer früheren Aminosäurepermease. Bei Thi9 handelt es sich vielmehr um einen sehr spezifischen Thiamintransporter, der ausschließlich strukturell sehr ähnliche Verbindungen transportiert.

Hydroxymethylthiazol (HET) inhibierte die Thiaminaufnahme unerwartet stark und wirkte damit ebenso gut als Kompetitor wie Thiamin oder Pyrithiamin. Wachstumstests mit biosynthese- und/oder transportdefizienten *nmt2Δ* und *nmt2Δ thi9Δ* Zellen bestätigten, dass HET nicht nur an Thi9 bindet, sondern tatsächlich von Thi9 in die Zellen transportiert wird (Abb. 2.12 C). Damit würde Thi9 neben dem Thiamintransport gleichzeitig eine Salvage-Funktion besitzen indem es die Thiazoleinheit aufnimmt und für die Thiaminbiosynthese zur Verfügung stellt. Die HMP-Einheit des Thiamins war nicht in der Lage, den Wachstumsdefekt der *nmt2Δ* Mutante zu komplementieren und wird somit nicht von Thi9 transportiert, ebenso wenig wie die Pyridine Pyridoxin, desoxy-Pyridoxin und Amilorid. Damit unterscheidet sich Thi9 klar von Bsu1 und von Thi7 aus *S. cerevisiae*, welches sein Substrat an der HMP-Einheit erkennt (91, 92).

Fasst man die Kompetitorstudien für Thi9 zusammen, lassen sich keine bzw. noch keine klaren Aussagen über die strukturellen Bedingungen eines möglichen Substrats von Thi9 treffen. Das Transportprotein scheint selektiv den Thiazolring des Thiamins zu erkennen und keine Spezifität für eine Pyrimidin (HMP)- oder Pyridin (Pyridoxin)-Einheit zu besitzen. Andererseits ist die Thiazolstruktur in Pyrithiamin, das ebenso gut wie Thiamin transportiert wird, gegen eine Pyridinstruktur ausgetauscht. Eine Gemeinsamkeit zwischen Thiazol, Thiamin und Pyrithiamin könnte das unter den pH-Bedingungen des Aufnahmetests positiv geladene Stickstoffatom sein. Wäre dies das einzige Kriterium, dann wäre allerdings auch eine Inhibition durch basische Aminosäuren zu erwarten gewesen. Um als Substrat zu wirken, bedarf es also des Zusammenspiels einer Reihe von Faktoren wie Ladung und Grundstruktur des Heterozyklus sowie passender Substituenten.

Obwohl Thiamin die Schnittmenge der Substratspezifitäten der Protonensymporter Thi9 und Bsu1 bildet, scheinen sich die beiden Proteine in den Transporteigenschaften für ihr gemeinsames Substrat zu unterscheiden. Die Aufnahmeaktivität von Bsu1 war im Vergleich zu Thi9 deutlich schwächer und betrug in einer *thi9Δ* Mutante nur 25% der Aktivität von Wildtypzellen, während *bsu1Δ* Zellen 56% der Wildtypaktivität besaßen (Abb. 2.14 B). Zudem war es nur bei Überexpression in der Lage, den Wachstumsdefekt der thiaminauxotrophen Bäckerhefemutante CVY4 zu

komplementieren, und auch das nur bis zu 1,2  $\mu\text{M}$  Thiamin. Dagegen ermöglichte Thi9 noch auf einer bis zu 100fach niedrigeren Konzentration das Wachstum der Zellen (Abb. 2.13 A). Das erklärt auch, wieso im ursprünglichen Komplementationstest, der in Gegenwart von 0,12  $\mu\text{M}$  Thiamin durchgeführt wurde, ausschließlich *thi9*<sup>+</sup> und nicht *bsu1*<sup>+</sup> als Mutlicopy-Suppressor gefunden wurde. Die höhere Transportaktivität von Thi9 verhinderte bislang auch, den postulierten Beitrag von Bsu1 in der Thiaminaufnahme nachzuweisen (185). Eine genauere kinetische Charakterisierung von Bsu1 sollte Aufschluss sowohl über seine Transporteigenschaft für Thiamin als auch seine Rolle im Thiaminstoffwechsel geben. Die Tatsache, dass Pyridoxin die Vorstufe von HMP darstellt, wird auch in der hohen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Verbindungen deutlich. Deshalb wäre es durchaus denkbar, dass Bsu1 eine Salvage-Funktion übernimmt, indem es HMP in die Zellen transportiert. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass HMP nur dann den Wachstumsdefekt einer *nmt1Δ* Mutante, deren HMP-Biosynthese blockiert ist, komplementieren konnte, wenn *bsu1*<sup>+</sup> exprimiert war (185).

Die grundsätzlich unterschiedliche Substratspezifität von Thi9 und Bsu1 zeigt sich auch darin, dass ihre Aufnahmeaktivität nicht durch den Inhibitor des jeweils anderen Transporters – Pyrithiamin bzw. Amilorid – gehemmt wird. Während die Deletion von *thi9*<sup>+</sup> einerseits keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Amilorid hatte, für die ausschließlich Bsu1 verantwortlich ist (J. Stolz, unveröffentlicht), reichte sie andererseits für sich alleine aus, um Wildtypzellen selbst bei hohen Pyrithiaminkonzentrationen Resistenz zu verleihen (Abb. 2.13 B). Deshalb ist davon auszugehen, dass Pyrithiamin nicht von Bsu1 transportiert wird.

Die Thiaminaufnahme über die menschlichen Transporter ThTr-1 und ThTr-2 ist dagegen durch Amilorid inhibierbar, was für eine Erkennung der HMP-Einheit des Thiamins sprechen würde. Auch auf Ebene des Aufnahmemechanismus gibt es keine Gemeinsamkeiten der menschlichen Orthologen, weder mit Thi9 noch mit Thi7 aus *S. cerevisiae*. Während diese ihr Substrat durch Protonensymport transportieren, erfolgt der Transport beim Menschen durch Protonenantipport (66). Dies verdeutlicht einmal mehr den unterschiedlichen evolutionären Ursprung der Thiamintransporter.

## **II.D.4 Die Regulation der Genexpression durch Thiamindiphosphat**

Neben seiner wichtigen Aufgabe als Enzym-Cofaktor im Stoffwechsel hat Thiamin in allen Organismen auch eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Genexpression. Der weit verbreitete Mechanismus der Feedback-Inhibierung, der für viele Stoffwechselwege bekannt ist, reguliert auch die Biosynthese von Thiamin und gewährleistet, dass keine unnötige Energie für seine Herstellung aufgewendet wird. In *S. cerevisiae* beispielsweise werden in Abwesenheit von Thiamin 20 Gene mindestens 10fach und 40 Gene 3-10fach stärker exprimiert (195). Dabei bildet die Cofaktor-Form des Thiamins, Thiamindiphosphat (TDP), das ubiquitäre Signalmolekül, das auf unterschiedliche Weise auf die Genexpression der an der Thiaminbiosynthese bzw. Thiaminaufnahme

beteiligten Gene wirken kann. Bislang sind zwei entsprechende Regulationsmechanismen bekannt: In *S. cerevisiae* führt die Bindung von TDP an einen Transkriptionsfaktor oder ein daran assoziiertes Protein zur Inhibierung der Transkription. In Bakterien und höheren Eukaryoten dagegen bindet TDP ohne Beteiligung eines Proteins an ein Riboswitch-Element und steuert damit die weitere Prozessierung der mRNA. Beide Möglichkeiten sollen nachfolgend für *S. pombe* erörtert werden.

Neben *bsu1*<sup>+</sup>, *nmt1*<sup>+</sup>, *nmt2*<sup>+</sup> und *pho4*<sup>+</sup>, deren Produkte an der Biosynthese bzw. an der Aufnahme von Thiamin in *S. pombe* beteiligt sind, wurde mit *thi9*<sup>+</sup> ein weiteres Gen identifiziert, das der Kontrolle durch Thiamin unterliegt. Innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von Thiamin ging die *thi9*<sup>+</sup> mRNA auf ein Drittel des Ausgangsniveaus zurück und war nach 20 min fast nicht mehr nachweisbar (Abb. 2.17). Die Promotorregionen von *thi9*<sup>+</sup>, *nmt1*<sup>+</sup>, *nmt2*<sup>+</sup> und *pho4*<sup>+</sup> sind sehr divergent zueinander und enthalten keine signifikanten Konsensussequenzen. Das bedeutet, dass der *thi9*<sup>+</sup> Promotor nicht durch Duplikation entstanden sein kann. Die einzige Gemeinsamkeit mit anderen *THI*-Genen sind die TR-Elemente im 5'-nicht-translatierten Bereich, deren Rolle in der Regulation der Genexpression ungeklärt ist (297). In *S. cerevisiae* enthalten die Promotorbereiche von *PHO3* und anderer *THI*-Gene (*THI3*, *THI4*, *THI6*, *THI20*, *THI21*, *THI22*, *THI80*) ebenfalls eine konservierte regulatorische Sequenz (5'-GNAACC/TTTAGA-3'), die in beiden Orientierungen vorliegen kann und von dem Transkriptionsfaktor Thi2 gebunden wird (76). In dem postulierten Modell zur Thiaminregulation in Bäckerhefe übernimmt Thi3 die Rolle des Sensors, indem es TDP binden kann (Abb. 2.3 A). Nur in Abwesenheit des Cofaktors bildet sich der Initiationskomplex aus Thi3, Thi2 und Pdc2, der die Transkription der *THI*-Gene induziert. Ein ähnlicher Mechanismus wäre unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Thi1, Thi5 und bislang unbekannter Faktoren, wie den Genprodukten der Loci *tnr1* oder *tnr2*, auch für die Thiaminregulation in Spaltheefe denkbar. *S. pombe* besitzt vier Gene – SPAC13A11.06, SPAC1F8.07c, SPAC3G9.11c und SPAC186.09 –, deren Genprodukte aufgrund ihrer Homologie mögliche Pyruvatdecarboxylasen darstellen könnten und zu 25 bis 35% mit Thi3 aus *S. cerevisiae* identisch sind. Da sie auch das konservierte GDGX<sub>24</sub>NN Motiv zur TDP-Bindung im C-terminalen Bereich enthalten, könnten sie damit die Funktion der TDP-Wahrnehmung in der thiaminabhängigen Genexpression übernehmen.

Im Gegensatz zu dieser klassischen Regulation durch Transkriptionsfaktoren haben Pflanzen, Algen und einige filamentöse Pilze wie *Neurospora crassa* oder *Aspergillus oryzae* einen unter Eukaryoten bislang einzigartigen Mechanismus für die thiaminabhängige Genregulation entwickelt, der auf dem Prinzip des bakteriellen Riboswitches basiert. Ein RNA-Abschnitt, der häufig im ersten Intron des jeweiligen Biosynthesegens oder im 3'-nicht-translatierten Bereich nahe des Poly-A Endes liegt, ist in der Lage, Thiamindiphosphat zu binden. Während dadurch in Bakterien die Transkription bzw. Translationsinitiation gesteuert wird, kontrolliert der Riboswitch in höheren Organismen das korrekte Spleißen bzw. die Modifikation oder Stabilität der mRNA (41, 128, 248, 270). Die TDP-Bindedomäne in der pre-mRNA verhindert in Gegenwart von Thiamin das Spleißen des langen 3'-nicht-translatierten Bereichs, was zu einem erhöhten RNA Turnover durch gesteigerten Abbau

(„nonsense-mediated decay“) führt (180). Außer *mfm2*<sup>+</sup> und SPBC1604.04 verfügt kein anderes der identifizierten thiaminabhängig regulierten Gene (*thi9*<sup>+</sup> eingeschlossen) in *S. pombe* über Introns, die, wie auch die 5'- oder 3'-nicht-translatierten Bereiche der übrigen *THI*-Gene, keine erkennbare Konsensussequenz eines Riboswitch-Elements enthalten. Diese Tatsache und die Identifizierung der beiden DNA-bindenden Proteine Thi1 und Thi5 sprechen dafür, dass auch in der Spaltheife die Repression thiaminregulierter Gene durch die Bindung von TDP an Transkriptionsfaktoren vermittelt wird.

Dennoch wäre es denkbar, dass der 3'-Bereich von *thi9*<sup>+</sup> zu dem außerordentlich schnellen Rückgang seiner mRNA beiträgt. Die flankierenden 5'- und 3'-Bereiche eines ORFs regulieren nicht nur die Stabilität der mRNA, sondern auch ihren Transport, ihre Lokalisation sowie die Effizienz ihrer Translation (45, 55, 77, 238). Das Gen *rum1*<sup>+</sup> kodiert für einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase in *S. pombe*, dessen mRNA mit zwei Minuten dieselbe kurze Halbwertszeit besitzt wie die *thi9*<sup>+</sup> mRNA (48). Die Stabilität der *rum1*<sup>+</sup> mRNA wird durch ein Element in ihrem 3'-Bereich bestimmt, welches Ähnlichkeit zu AU-Reichen Elementen (ARE) besitzt. AREs sind nachweislich für die Stabilität eines Transkripts und damit für seine Menge verantwortlich (38).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten TDP das intrazelluläre Signalmolekül für die Regulation des Thiaminstoffwechsels darstellt. Über verschiedene Mechanismen bewirkt es die Veränderung der Expression von Genen, die hauptsächlich an der Biosynthese oder am Transport von Thiamin beteiligt sind.

## **II.D.5 Ein *thi9Δ* Stamm verändert die thiaminabhängige Genexpression**

Auf der Regulation des *nmt1*<sup>+</sup> Gens durch Thiamin beruht das gängigste Expressionssystem für *S. pombe*. Trotz der großen Bedeutung der Spaltheife in der Grundlagenforschung und als Modellorganismus gibt es im Gegensatz zu *S. cerevisiae* nur eine geringe Anzahl an verfügbaren (Expressions-)Vektoren. Maundrell et al. (161) konstruierten extrachromosomale (pREP) und integrative (pRIP) Vektoren, die den Promotor und das Polyadenylierungssignal des *nmt1*<sup>+</sup> Gens enthalten. Dies ermöglicht die Repression in Anwesenheit und die Induktion in Abwesenheit von Thiamin. Da die zur Expression verwendeten Zellen fähig sind, Thiamin zu transportieren, können sie während der Repressionsphase große Mengen an Thiamin akkumulieren. Deshalb ist gründliches Waschen der Zellen erforderlich, um das Thiamin vollständig zu entfernen. Zudem müssen sie für mindestens 15 bis 18 Stunden in Medium ohne Thiamin inkubiert werden, damit die interne, reprimierende Schwellenkonzentration unterschritten und das maximale Expressionsniveau erreicht wird. Das ist zeitintensiv und stellt einen großen Nachteil dieses Systems dar. Kumar et al. (129) optimierten es, indem sie in einem Genbankscreen einen verkürzten *nmt1*<sup>+</sup> Promotor isolierten, der nur aus den 185 Basenpaaren vor dem Start-ATG besteht. Daraus ergaben sich zwei unerwartete Vorteile: Die Promotoraktivität ließ sich durch das Wachstum bei 25°C (permissiv) oder 36°C (restriktiv)

kontrollieren und die maximale Expression war bereits nach drei Stunden erreicht. Allerdings birgt auch dieser Ansatz einen Nachteil, da nur etwa 8% der Expressionsstärke des Wildtyp-Promotors erreicht wurden.

Überlegungen, dass *thi9Δ* Mutanten kein bzw. weniger Thiamin akkumulieren können und der *nmt1<sup>+</sup>* Promotor dadurch schneller induziert werden kann, wurden von Angelika Batke in ersten Versuchen mit einem GFP-Reporter bestätigt (A. Batke, J. Stolz, unveröffentlicht). Nach rund zehn Stunden war das maximale Expressionsniveau erreicht, das genauso hoch war wie in Wildtypzellen. Ihnen gegenüber besitzen *thi9Δ* Zellen zwei große Vorteile. Zum einen war die Expression selbst bei 1,2 μM Thiamin – der Konzentration im Standardmedium – noch maximal aktiv. Da die Zellen Thiamin nicht aktiv aufnehmen konnten, wurde eine nahezu vollständige Repression erst durch die Zugabe von 120 μM Thiamin erreicht. Zum anderen nahm die Expressionsstärke durch die steigende Thiaminkonzentration graduell ab, und nicht sprunghaft wie in Wildtypzellen. Das erlaubt eine Feinabstimmung der Expression, was hauptsächlich bei Genprodukten hilfreich ist, die in großen Mengen für die Zellen toxisch sind.

## **II.D.6      Ausblick**

Hinsichtlich der thiaminabhängigen Regulation der Genexpression in *S. pombe* bleiben noch viele Fragen offen, etwa die nach dem regulierenden Element in den Promotoren der *THI*-Gene. Die Identifizierung der von *tnr1* und *tnr2* kodierten Proteine sollte bzw. könnte dazu beitragen, den Signalweg des Thiamindiphosphats in der Zelle und die Funktion der Transkriptionsfaktoren Thi1 und Thi5 aufzuklären.

Des Weiteren sollte Bsu1 als Thiamin- oder auch als möglicher HMP-Transporter bezüglich seiner Aktivität, Kinetik und Spezifität näher charakterisiert werden, was eine Aussage über seine Funktion zuließe und das Gesamtbild des Thiaminstoffwechsel komplettieren würde.

### III. Zusammenfassung

Aufgrund eines konservierten Riboswitch-Elements im 5'-Bereich der Gene *ypaA* aus *B. subtilis* und *ribM* aus *C. glutamicum* wurde vermutet, dass die von ihnen kodierten Proteine eine Funktion im Stoffwechsel von Riboflavin besitzen (263). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten YpaA und RibM nun als die ersten bakteriellen Riboflavintransporter charakterisiert werden. Während YpaA, dessen C-Terminus cytoplasmatisch orientiert ist, mit fünf vorhergesagten TMDs zur BART-Superfamilie gehört, ist RibM sehr homolog zur bakteriellen Familie der Nikotinamidribosid-Transporter PnuC. Die Deletion von *ypaA* führte zum Verlust, die Überexpression von *ypaA* dagegen zu einer stark erhöhten Aufnahme von Riboflavin und Roseoflavin. Sowohl die Transportaktivität einer *B. subtilis* Biosynthesemutante als auch die vorhandene Proteinmenge an YpaA hingen von der Riboflavinkonzentration im Medium ab. Im Gegensatz zu RibM war der Riboflavintransport über YpaA durch Protonophoren inhibierbar und nur in Gegenwart von Glucose nachweisbar. Das spricht dafür, dass es sich bei RibM um einen Facilitator und bei YpaA um den ersten bekannten sekundär aktiven Riboflavintransporter handelt, der sein Substrat durch Protonensymport transportiert. Während *ypaA* nicht funktionell in *E. coli* exprimiert werden konnte, vermittelte RibM in dem Gram-negativen Bakterium die spezifische und hoch-affine Aufnahme von Riboflavin und Roseoflavin mit einem  $K_m$ -Wert von  $11 \pm 6 \mu\text{M}$ . Damit ist ein wichtiger Schritt zur Etablierung eines Expressionssystems gelungen, das die Synthese von Flavoproteinen mit nicht-natürlichen Flavinanaloga als Liganden erlaubt. Eine selektive Beladung mit Roseoflavin konnte für das Flavoprotein Dodecin erzielt werden.

Mit dem Plasmamembranprotein Thi9 wurde in dieser Arbeit der erste Vertreter einer neuartigen Klasse von Thiamintransportern identifiziert, der keine Ähnlichkeit zu den bekannten Transportern aus Bakterien, der Hefe *S. cerevisiae* oder aus Säugern aufweist. Aufgrund der Homologie zu Permeasen für GABA, Choline, Polyamine oder basischen Aminosäuren aus *S. cerevisiae* wird es der ACT Familie innerhalb der APC Superfamilie (TC 2.A.3.4) zugeordnet, aus der es sich vermutlich durch konvergente Evolution zu einem Thiamintransporter entwickelt hat. Ebenso wie seine Homologen besitzt es zwölf TMDs, die es in der Plasmamembran verankern. Thi9 verfügt über eine hohe und eng begrenzte Spezifität für Thiamin, das es energieabhängig und durch Protonensymport aufnimmt. Während die Thiazoleinheit ebenso gut von Thi9 transportiert wurde wie Thiamin selbst, wurde HMP nicht aufgenommen. Im Gegensatz zu den Thiaminanaloga Pyrithiamin und Oxythiamin waren die Substrate der homologen Proteine – GABA, Cholin, basische Aminosäuren oder positiv geladene Ionen – nicht in der Lage, die Thiaminaufnahme zu inhibieren. Die Transkription von *thi9*<sup>+</sup> wurde durch die Zugabe von Thiamin, nicht aber von Pyridoxin, zum Medium sehr rasch reprimiert. Das bestehende Thi9 Protein in der Plasmamembran hingegen blieb stabil und unterlag keinem aktiven Abbau.

Neben Thi9 besitzt *S. pombe* mit Bsu1 über eine weitere Möglichkeit, Thiamin aus dem Medium aufzunehmen. Das bislang als Pyridoxintransporter beschriebene Protein Bsu1 war bei Überexpression ebenfalls in der Lage, den Wachstumsdefekt einer thiaminauxotrophen Bäckerhefemutante zu komplementieren.



## IV. Literaturverzeichnis

1. **Ahmad, M., and A. R. Cashmore.** 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**:162-6.
2. **Andersson, H., and G. von Heijne.** 1994. Membrane protein topology: effects of delta mu H<sup>+</sup> on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J* **13**:2267-72.
3. **Araki, M., Y. Okuno, Y. Hara, and Y. Sugiura.** 1998. Allosteric regulation of a ribozyme activity through ligand-induced conformational change. *Nucleic Acids Res* **26**:3379-84.
4. **Bacher, A., S. Eberhardt, M. Fischer, K. Kis, and G. Richter.** 2000. Biosynthesis of vitamin b<sub>2</sub> (riboflavin). *Annu Rev Nutr* **20**:153-67.
5. **Bacher, A., S. Eberhardt, and G. Richter.** 1996. Biosynthesis of Riboflavin. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology:657-664.
6. **Bafunno, V., T. A. Giancaspero, C. Brizio, D. Bufano, S. Passarella, E. Boles, and M. Barile.** 2004. Riboflavin uptake and FAD synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: involvement of the Flx1p carrier in FAD export. *J Biol Chem* **279**:95-102.
7. **Baichoo, N., T. Wang, R. Ye, and J. D. Helmann.** 2002. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**:1613-29.
8. **Bandrin, S. V., M. I. u. Beburrov, P. M. Rabinovich, and A. I. Stepanov.** 1979. [Riboflavin auxotrophs of *Escherichia coli*]. *Genetika* **15**:2063-5.
9. **Barabote, R. D., and M. H. Saier.** 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:608-34.
10. **Barbet, N., W. J. Muriel, and A. M. Carr.** 1992. Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**:59-66.
11. **Barile, M., D. Valenti, C. Brizio, E. Quagliariello, and e. al.** 1998. Rat liver mitochondria can hydrolyse thiamine pyrophosphate to thiamine monophosphate which can .... *FEBS Letters*.
12. **Basi, G., E. Schmid, and K. Maundrell.** 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**:131-6.
13. **Begley, T. P.** 1996. The biosynthesis and degradation of thiamin (vitamin B<sub>1</sub>). *Natural product reports* **13**:177-85.
14. **Belanger, F. C., T. Leustek, B. Chu, and A. L. Kriz.** 1995. Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Mol Biol* **29**:809-21.
15. **Belenky, P. A., T. G. Moga, and C. Brenner.** 2008. *S. cerevisiae* YOR071C encodes the high affinity nicotinamide Riboside transporter, Nrt1. *J Biol Chem*.
16. **Bettendorff, L.** 2007. At the crossroad of thiamine degradation and biosynthesis. *Nat Chem Biol* **3**:454-5.
17. **Bettendorff, L., B. Wirtzfeld, A. F. Makarchikov, G. Mazzucchelli, M. Frédérich, T. Gigliobianco, M. Gangolf, E. De Pauw, L. Angenot, and P. Wins.** 2007. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nat Chem Biol* **3**:211-2.
18. **Bieger, B., L. O. Essen, and D. Oesterhelt.** 2003. Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. *Structure* **11**:375-85.
19. **Blyth, A. W.** 1879. The Composition of Cows' Milk in Health and Disease. *J. Chem. Soc.* **35**:530-539.
20. **Bogdanov, M., and W. Dowhan.** 1995. Phosphatidylethanolamine is required for *in vivo* function of the membrane-associated lactose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**:732-9.
21. **Bogdanov, M., P. N. Heacock, and W. Dowhan.** 2002. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *Embo J* **21**:2107-16.
22. **Bonner, J.** 1937. Vitamin B<sub>1</sub> a growth factor for higher plants. *Science* **85**:183-184.
23. **Boretsky, Y. R., K. Y. Kapustyak, L. R. Fayura, O. V. Stasyk, M. M. Stenchuk, Y. P. Bobak, L. B. Drobot, and A. A. Sibirny.** 2005. Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. *FEMS Yeast Res* **5**:829-37.
24. **Bowman, B. B., D. B. McCormick, and I. H. Rosenberg.** 1989. Epithelial transport of water-soluble vitamins. *Annu Rev Nutr* **9**:187-99.

25. **Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J. D. Boeke.** 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**:115-32.
26. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
27. **Briggs, W. R.** 2007. The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *J Biomed Sci* **14**:499-504.
28. **Burdick, R.** 1998. Thiamin. Howe-Grant M (ed) *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology* **25**:152-171.
29. **Burgess, C., M. O'connell-Motherway, W. Sybesma, J. Hugenholtz, and D. van Sinderen.** 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Appl Environ Microbiol* **70**:5769-77.
30. **Burgess, C. M., D. J. Slotboom, E. R. Geertsma, R. H. Duurkens, B. Poolman, and D. van Sinderen.** 2006. The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism. *J Bacteriol* **188**:2752-60.
31. **Burns, K. E., Y. Xiang, C. L. Kinsland, F. W. McLafferty, and e. al.** 2005. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc*.
32. **Candy, J. M., and R. G. Duggleby.** 1998. Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1385**:323-38.
33. **Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, Y. J. Wu, and D. Liu.** 1999. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**:760-5.
34. **Cecchini, G., and E. B. Kearney.** 1980. Uptake and binding of riboflavin by membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J Supramol Struct* **13**:93-100.
35. **Cecchini, G., M. Perl, J. Lipsick, T. P. Singer, and E. B. Kearney.** 1979. Transport and binding of riboflavin by *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **254**:7295-301.
36. **Chatterjee, A., C. T. Jurgenson, F. C. Schroeder, S. E. Ealick, and T. P. Begley.** 2007. Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate. *J Am Chem Soc* **129**:2914-22.
37. **Chen, C. C., and T. H. Wilson.** 1984. The phospholipid requirement for activity of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **259**:10150-8.
38. **Chen, C. Y., and A. B. Shyu.** 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**:465-70.
39. **Cheng, G., E. M. Bennett, T. P. Begley, and S. E. Ealick.** 2002. Crystal structure of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate kinase from *Salmonella typhimurium* at 2.3 Å resolution. *Structure* **10**:225-35.
40. **Cooke, G., Y. M. Legrand, and V. M. Rotello.** 2004. Model systems for flavoenzyme activity: an electrochemically tuneable model of roseoflavin. *Chem Commun (Camb)*:1088-9.
41. **Croft, M. T., M. Moulin, M. E. Webb, and A. G. Smith.** 2007. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
42. **Croft, M. T., M. J. Warren, and A. G. Smith.** 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell* **5**:1175-83.
43. **Cronan, J. E.** 2003. Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol* **57**:203-24.
44. **Crossley, R. A., D. J. Gaskin, K. Holmes, F. Mulholland, J. M. Wells, D. J. Kelly, A. H. van Vliet, and N. J. Walton.** 2007. Riboflavin biosynthesis is associated with assimilatory ferric reduction and iron acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*.
45. **Curtis, D., R. Lehmann, and P. D. Zamore.** 1995. Translational regulation in development. *Cell* **81**:171-8.
46. **Cutting, S. M., and P. B. V. Horn.** 1990. *Genetic Analysis*. John Wiley and Sons, Chichester.
47. **Czerniecki, J., and M. Czygier.** 2001. Cooperation of divalent ions and thiamin diphosphate in regulation of the function of pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *J Nutr Sci Vitaminol* **47**:385-6.
48. **Daga, R. R., P. Bolaños, and S. Moreno.** 2003. Regulated mRNA stability of the Cdk inhibitor Rum1 links nutrient status to cell cycle progression. *Curr Biol* **13**:2015-24.
49. **Demain, A. L.** 1972. Riboflavin oversynthesis. *Annu Rev Microbiol* **26**:369-88.

50. **Deus, B., and H. Blum.** 1970. Subcellular distribution of thiamine pyrophosphokinase activity in rat liver and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **219**:489-92.
51. **Deutscher, J., C. Francke, and P. W. Postma.** 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:939-1031.
52. **Dickinson, J. R., M. M. Lanterman, D. J. Danner, B. M. Pearson, P. Sanz, S. J. Harrison, and M. J. Hewlins.** 1997. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**:26871-8.
53. **Dix, B. A., and J. P. Lambooy.** 1981. Brain monoamine oxidase and replacement of its coenzyme flavin in rats. *J Nutr* **111**:1397-402.
54. **Drew, D., D. Sjöstrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier, and G. von Heijne.** 2002. Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:2690-5.
55. **Dreyfuss, G., V. N. Kim, and N. Kataoka.** 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:195-205.
56. **Duurkens, R. H., M. B. Tol, E. R. Geertsma, H. P. Permentier, and D. J. Slotboom.** 2007. Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU. *J Biol Chem* **282**:10380-6.
57. **Edmondson, D. E., and P. Newton-Vinson.** 2001. The covalent FAD of monoamine oxidase: structural and functional role and mechanism of the flavinylation reaction. *Antioxid Redox Signal* **3**:789-806.
58. **Edwards, A. M., C. Bueno, A. Saldaño, E. Silva, K. Kassab, L. Polo, and G. Jori.** 1999. Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins. *J Photochem Photobiol B, Biol* **48**:36-41.
59. **Enjo, F., K. Nosaka, M. Ogata, A. Iwashima, and H. Nishimura.** 1997. Isolation and characterization of a thiamin transport gene, *THI10*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**:19165-70.
60. **Fankhauser, H., and M. E. Schweingruber.** 1994. Thiamine-repressible genes in *Schizosaccharomyces pombe* are regulated by a Cys6 zinc-finger motif-containing protein. *Gene* **147**:141-4.
61. **Fankhauser, H., A. Zurlinden, A. M. Schweingruber, E. Edenharter, and M. E. Schweingruber.** 1995. *Schizosaccharomyces pombe* thiamine pyrophosphokinase is encoded by gene *tnr3* and is a regulator of thiamine metabolism, phosphate metabolism, mating, and growth. *J Biol Chem* **270**:28457-62.
62. **Faou, P., and M. Tropschug.** 2004. *Neurospora crassa* CyPBP37: a cytosolic stress protein that is able to replace yeast Thi4p function in the synthesis of vitamin B1. *J Mol Biol* **344**:1147-57.
63. **Foraker, A. B., C. M. Khantwal, and P. W. Swaan.** 2003. Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:1467-83.
64. **Förster, C., J. L. Revuelta, and R. Krämer.** 2001. Carrier-mediated transport of riboflavin in *Ashbya gossypii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:85-9.
65. **Galperin, M. Y.** 2001. Conserved 'Hypothetical' Proteins: New Hints and New Puzzles. *Comparative and Functional Genomics*.
66. **Ganapathy, V., S. B. Smith, and P. D. Prasad.** 2004. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch* **447**:641-6.
67. **Gastaldi, G., G. Ferrari, A. Verri, D. Casirola, M. N. Orsenigo, and U. Laforenza.** 2000. Riboflavin phosphorylation is the crucial event in riboflavin transport by isolated rat enterocytes. *J Nutr* **130**:2556-61.
68. **Gelfand, M. S., A. A. Mironov, J. Jomantas, Y. I. Kozlov, and D. A. Perumov.** 1999. A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends Genet* **15**:439-42.
69. **Gietz, R. D., and A. Sugino.** 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527-34.
70. **Gomelsky, M., and G. Klug.** 2002. BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in Biochemical Sciences*.
71. **Grill, S., H. Yamaguchi, H. Wagner, L. Zwahlen, U. Kusch, and M. Mack.** 2007. Identification and characterization of two *Streptomyces davawensis* riboflavin biosynthesis gene clusters. *Arch Microbiol* **188**:377-87.

72. **Grininger, M., F. Seiler, K. Zeth, and D. Oesterhelt.** 2006. Dodecin sequesters FAD in closed conformation from the aqueous solution. *J Mol Biol* **364**:561-6.
73. **Grininger, M., K. Zeth, and D. Oesterhelt.** 2006. Dodecins: a family of lumichrome binding proteins. *J Mol Biol* **357**:842-57.
74. **Grossmann, G., M. Opekarova, L. Novakova, J. Stolz, and W. Tanner.** 2006. Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **5**:945-53.
75. **Guérout-Fleury, K. Shazand, N. Frandsen, and P. Stragier.** 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*.
76. **Harbison, C. T., D. B. Gordon, T. I. Lee, N. J. Rinaldi, K. D. Macisaac, T. W. Danford, N. M. Hannett, J. B. Tagne, D. B. Reynolds, J. Yoo, E. G. Jennings, J. Zeitlinger, D. K. Pokholok, M. Kellis, P. A. Rolfe, K. T. Takusagawa, E. S. Lander, D. K. Gifford, E. Fraenkel, and R. A. Young.** 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**:99-104.
77. **Hazelrigg, T.** 1998. The destinies and destinations of RNAs. *Cell* **95**:451-60.
78. **Hebbeln, P., D. A. Rodionov, A. Alfandega, and T. Eitingner.** 2007. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:2909-14.
79. **Hefti, M. H., J. Vervoort, and W. J. van Berkel.** 2003. Deflavination and reconstitution of flavoproteins. *Eur J Biochem* **270**:4227-42.
80. **Heijne, G. V.** 1986. The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* **5**:3021-3027.
81. **Herbert, M., E. Sauer, G. Smethurst, A. Kraiss, A. K. Hilpert, and J. Reidl.** 2003. Nicotinamide ribosyl uptake mutants in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **71**:5398-401.
82. **Higashitsuji, Y., A. Angerer, S. Berghaus, B. Hobl, and M. Mack.** 2007. RibR, a possible regulator of the *Bacillus subtilis* riboflavin biosynthetic operon, in vivo interacts with the 5'-untranslated leader of rib mRNA. *FEMS Microbiol Lett* **274**:48-54.
83. **Hofmann, K., and W. Stoffel.** 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **347**:166ff.
84. **Hohmann, S.** 1993. Characterisation of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **241**:657-66.
85. **Hohmann, S., and P. A. Meacock.** 1998. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* **1385**:201-19.
86. **Hollenbach, A. D., K. A. Dickson, and M. W. Washabaugh.** 2002. Thiamine transport in *Escherichia coli*: the mechanism of inhibition by the sulfhydryl-specific modifier N-ethylmaleimide. *Biochim Biophys Acta* **1564**:421-8.
87. **Holmes, D. S., and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**:193-7.
88. **Hughenoltz, J., and E. J. Smid.** 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **13**:497-507.
89. **Hughenoltz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. van Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols, and M. Kleerebezem.** 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:217-35.
90. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-8.
91. **Iwashima, A., Y. Kawasaki, and Y. Kimura.** 1990. Transport of 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1022**:211-4.
92. **Iwashima, A., Y. Kimura, and Y. Kawasaki.** 1990. Transport overshoot during 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1028**:161-4.
93. **Iwashima, A., and H. Nishimura.** 1979. Isolation of a thiamine-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **577**:217-20.
94. **Iwashima, A., H. Nishimura, and Y. Nose.** 1979. Soluble and membrane-bound thiamine-binding proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **557**:460-8.

95. **Iwashima, A., H. Nishino, and Y. Nose.** 1973. Carrier-mediated transport of thiamine in baker's yeast. *Biochim Biophys Acta* **330**:222-34.
96. **Iwashima, A., H. Nishino, K. Sempuku, and H. Nishimura.** 1981. Interaction of basic dyes with the thiamine transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*.
97. **Iwashima, A., K. Nosaka, H. Nishimura, and Y. Kimura.** 1986. Some properties of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant resistant to 2-amino-4-methyl-5-beta-hydroxyethylthiazole. *J Gen Microbiol* **132**:1541-6.
98. **Iwashima, A., and Y. Nose.** 1976. Regulation of thiamine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **128**:855-7.
99. **Iwashima, A., Y. Wakabayashi, and Y. Nose.** 1975. Thiamine transport mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **413**:243-7.
100. **Jack, D. L., I. T. Paulsen, and M. H. Saier.** 2000. The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology (Reading, Engl)* **146 (Pt 8)**:1797-814.
101. **Jansen, B. C. T., and W. F. Donath.** 1926. On the isolation of the anti-beriberi vitamin. *Proc. K. Akad. Wet. Amsterdam* **29**:1390.
102. **Jenkins, A. H., G. Schyns, S. Potot, G. Sun, and T. P. Begley.** 2007. A new thiamin salvage pathway. *Nat Chem Biol* **3**:492-7.
103. **Jenkins, C. C., J. Mata, R. F. Crane, B. Thomas, A. Akoulitchiev, J. Bähler, and C. J. Norbury.** 2005. Activation of AP-1-dependent transcription by a truncated translation initiation factor. *Eukaryotic Cell* **4**:1840-50.
104. **Joseph, P., J. R. Fantino, M. L. Herbaud, and F. Denizot.** 2001. Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **205**:91-7.
105. **Julliard, J. H., and R. Douce.** 1991. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B<sub>1</sub>) in higher plant chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:2042-5.
106. **Jurgenson, C. T., A. Chatterjee, T. P. Begley, and S. E. Ealick.** 2006. Structural insights into the function of the thiamin biosynthetic enzyme Thi4 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **45**:11061-70.
107. **Juri, N., Y. Kubo, S. Kasai, S. Otani, M. Kusunose, and K. Matsui.** 1987. Formation of roseoflavin from 8-amino- and 8-methylamino-8-demethyl-D-riboflavin. *J Biochem* **101**:705-11.
108. **Kahn, D. W., and B. M. Anderson.** 1986. Characterization of *Haemophilus influenzae* nucleotide pyrophosphatase. An enzyme of critical importance for growth of the organism. *J Biol Chem* **261**:6016-25.
109. **Kaiser, B., T. Munder, H. P. Saluz, W. Künkel, and R. Eck.** 1999. Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast* **15**:585-91.
110. **Kaltwasser, M., T. Wiegert, and W. Schumann.** 2002. Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **68**:2624-8.
111. **Kanellis, P., M. Gagliardi, J. P. Banath, R. K. Szilard, S. Nakada, S. Galicia, F. D. Sweeney, D. C. Cabelof, P. L. Olive, and D. Durocher.** 2007. A screen for suppressors of gross chromosomal rearrangements identifies a conserved role for PLP in preventing DNA lesions. *PLoS Genet* **3**:e134.
112. **Kawai, F., M. Shoda, R. Harashima, Y. Sadaie, H. Hara, and K. Matsumoto.** 2004. Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J Bacteriol* **186**:1475-83.
113. **Kawasaki, Y.** 1993. Copurification of hydroxyethylthiazole kinase and thiamine-phosphate pyrophosphorylase of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of hydroxyethylthiazole kinase as a bifunctional enzyme in the thiamine biosynthetic pathway. *J Bacteriol* **175**:5153-8.
114. **Kawasaki, Y., K. Nosaka, Y. Kaneko, H. Nishimura, and A. Iwashima.** 1990. Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**:6145-7.
115. **Kemmer, G., T. J. Reilly, J. Schmidt-Brauns, G. W. Zlotnik, B. A. Green, M. J. Fiske, M. Herbert, A. Kraiss, S. Schlör, A. Smith, and J. Reidl.** 2001. NadN and e (P4) are essential for utilization of NAD and nicotinamide mononucleotide but not nicotinamide riboside in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* **183**:3974-81.
116. **Kil, Y. V., V. N. Mironov, I. Gorishin, R. A. Kreneva, and D. A. Perumov.** 1992. Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region. *Mol Gen Genet* **233**:483-6.

117. **Kim, L., A. Mogk, and W. Schumann.** 1996. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**:71-6.
118. **Kim, Y. S., and J. P. Lambooy.** 1985. Covalent bonding of riboflavin homologs by hepatic mitochondrial membrane enzymes. *Int J Biochem* **17**:975-81.
119. **Kim, Y. S., and J. P. Lambooy.** 1978. Loss of hepatic monoamine oxidase activity resulting from replacement of its coenzyme flavin. *Proc Soc Exp Biol Med* **157**:466-71.
120. **Kis, K., and A. Bacher.** 1995. Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**:16788-95.
121. **Klein, C.** 2006. Identifikation des Thiamintransporters aus *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit. University of Regensburg, Regensburg.
122. **Knight, S. A., E. Lesuisse, R. Stearman, R. D. Klausner, and A. Dancis.** 2002. Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the *TUP1* regulator. *Microbiology* **148**:29-40.
123. **Koh, Y. S., J. Choih, J. H. Lee, and J. H. Roe.** 1996. Regulation of the *ribA* gene encoding GTP cyclohydrolase II by the *soxRS* locus in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **251**:591-8.
124. **Koser, S. A.** 1968. Vitamin Requirements of Bacteria and Yeasts, Chapter 10.
125. **Kreneva, R. A., M. S. Gelfand, A. A. Mironov, Y. A. Yomantus, and e. al.** 2000. Inactivation of the *ypaA* gene in *Bacillus subtilis*; analysis of the resulting phenotypic expression. *Russ. J. Genet.*
126. **Kreneva, R. A., and D. A. Perumov.** 1996. [Genetic mapping of an additional regulatory locus of the riboflavin operon of *Bacillus subtilis*]. *Genetika* **32**:1623-8.
127. **Kreneva, R. A., and D. A. Perumov.** 1990. Genetic mapping of regulatory mutations of *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Mol Gen Genet* **222**:467-9.
128. **Kubodera, T., M. Watanabe, K. Yoshiuchi, N. Yamashita, A. Nishimura, S. Nakai, K. Gomi, and H. Hanamoto.** 2003. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett* **555**:516-20.
129. **Kumar, R., and J. Singh.** 2006. A truncated derivative of *nmt1* promoter exhibits temperature-dependent induction of gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **23**:55-65.
130. **Kurth, R., W. Paust, and W. Haenlein.** 1996. Vitamins, Chapter 7, vol. A27. VCH, Weinheim.
131. **Kögl, F., and B. Tönnis.** 1936. *Z. Physiol. Chem.* **242**:43-73.
132. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
133. **Lakaye, B., B. Wirtzfeld, P. Wins, T. Grisar, and L. Bettendorff.** 2004. Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *J Biol Chem* **279**:17142-7.
134. **Lauhon, C. T., and J. W. Szostak.** 1995. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *J Am Chem Soc* **117**:1246-57.
135. **Lawhorn, B. G., R. A. Mehl, and T. P. Begley.** 2004. Biosynthesis of the thiamin pyrimidine: the reconstitution of a remarkable rearrangement reaction. *Org Biomol Chem* **2**:2538-46.
136. **Lee, C. Y., D. J. O'Kane, and E. A. Meighen.** 1994. Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum*. *J Bacteriol* **176**:2100-4.
137. **Lee, J. M., S. Zhang, S. Saha, S. Santa Anna, C. Jiang, and J. Perkins.** 2001. RNA expression analysis using an antisense *Bacillus subtilis* genome array. *J Bacteriol* **183**:7371-80.
138. **Leonardi, R., and P. L. Roach.** 2004. Thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*: *in vitro* reconstitution of the thiazole synthase activity. *J Biol Chem* **279**:17054-62.
139. **Liang, D. T., J. A. Hodson, and S. L. Forsburg.** 1999. Reduced dosage of a single fission yeast MCM protein causes genetic instability and S phase delay. *J Cell Sci* **112 (Pt 4)**:559-67.
140. **Lin, C., and D. Shalitin.** 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual review of plant biology* **54**:469-96.
141. **Lin, C., and T. Todo.** 2005. The cryptochromes. *Genome Biol* **6**:220.
142. **Liu, J. Y., D. E. Timm, and T. D. Hurley.** 2006. Pyrithiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J Biol Chem* **281**:6601-7.
143. **Llorente, B., and B. Dujon.** 2000. Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae DAL5* gene family and identification of the high affinity nicotinic acid permease *TNA1* (YGR260w). *FEBS Lett* **475**:237-41.

144. **Llorente, B., C. Fairhead, and B. Dujon.** 1999. Genetic redundancy and gene fusion in the genome of the Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: functional characterization of a three-member gene family involved in the thiamine biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* **32**:1140-52.
145. **Locher, K. P., A. T. Lee, and D. C. Rees.** 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-8.
146. **Lwoff, A., and H. Dusi.** 1939. Le thiazol, facteur de croissance pour le flagelle *Polytoma ocellatum*. *C. R. Acad. Sci.* **205**:882.
147. **Machado, C. R., R. L. de Oliveira, S. Boiteux, U. M. Praekelt, P. A. Meacock, and C. F. Menck.** 1996. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Mol Biol* **31**:585-93.
148. **Machado, C. R., U. M. Praekelt, R. C. de Oliveira, A. C. Barbosa, K. L. Byrne, P. A. Meacock, and C. F. Menck.** 1997. Dual role for the yeast *THI4* gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance. *J Mol Biol* **273**:114-21.
149. **Mack, M., and S. Grill.** 2006. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:265-75.
150. **Mack, M., A. P. van Loon, and H. P. Hohmann.** 1998. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J Bacteriol* **180**:950-5.
151. **Makarchikov, A. F., A. Brans, and L. Bettendorff.** 2007. Thiamine diphosphate adenylyl transferase from *E. coli*: functional characterization of the enzyme synthesizing adenosine thiamine triphosphate. *BMC Biochem* **8**:17.
152. **Malinska, K., J. Malinsky, M. Opekarova, and W. Tanner.** 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* **14**:4427-36.
153. **Manetti, A. G., M. Rosetto, and K. G. Maundrell.** 1994. *nmt2* of fission yeast: a second thiamine-repressible gene co-ordinately regulated with *nmt1*. *Yeast* **10**:1075-82.
154. **Manoil, C.** 1991. Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and beta-galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol* **34**:61-75.
155. **Manoil, C., J. J. Mekalanos, and J. Beckwith.** 1990. Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J Bacteriol* **172**:515-8.
156. **Mansour, N. M., M. Sawhney, D. G. Tamang, C. Vogl, and M. H. Saier.** 2007. The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J* **274**:612-29.
157. **Marobbio, C. M. T., A. Voza, M. Harding, F. Bisaccia, and e. al.** 2002. Identification and reconstitution of the yeast mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate. *The EMBO Journal*.
158. **Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier, and G. Rapoport.** 1990. Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J Mol Biol* **214**:657-71.
159. **Matsui, K., N. Juri, Y. Kubo, and S. Kasai.** 1979. Formation of roseoflavin from guanine through riboflavin. *J Biochem* **86**:167-75.
160. **Maundrell, K.** 1990. *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**:10857-64.
161. **Maundrell, K.** 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**:127-30.
162. **McIlvaine, T. C.** 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*.
163. **McQuire, T. A., and P. G. Young.** 2006. Joint regulation of the *nmt1* promoter and sporulation by Thi1 and Thi5 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **50**:269-79.
164. **Meighen, E. A.** 1994. Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu Rev Genet* **28**:117-39.
165. **Meighen, E. A.** 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* **55**:123-42.
166. **Meissner, B., E. Schleicher, S. Weber, and L. O. Essen.** 2007. The dodecin from *Thermus thermophilus*, a bifunctional cofactor storage protein. *J Biol Chem* **282**:33142-54.
167. **Messens, J., and S. Silver.** 2006. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol* **362**:1-17.
168. **Mewies, M., W. S. McIntire, and N. S. Scrutton.** 1998. Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: the current state of affairs. *Protein Sci* **7**:7-20.

169. **Miethke, M., and M. A. Marahiel.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:413-51.
170. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
171. **Miller, J. R., and D. E. Edmondson.** 1999. Influence of flavin analogue structure on the catalytic activities and flavinylation reactions of recombinant human liver monoamine oxidases A and B. *J Biol Chem* **274**:23515-25.
172. **Miller, J. R., and D. E. Edmondson.** 1999. Structure-activity relationships in the oxidation of para-substituted benzylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A. *Biochemistry* **38**:13670-83.
173. **Miller, J. R., N. Guan, F. Hubalek, and D. E. Edmondson.** 2000. The FAD binding sites of human liver monoamine oxidases A and B: investigation of the role of flavin ribityl side chain hydroxyl groups in the covalent flavinylation reaction and catalytic activities. *Biochim Biophys Acta* **1476**:27-32.
174. **Mironov, A. S., I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov, and E. Nudler.** 2002. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**:747-56.
175. **Mironov, V. N., D. A. Perumov, A. S. Kraev, A. I. Stepanov, and K. G. Skriabin.** 1990. [Unusual structure of the regulatory region of the riboflavin biosynthesis operon in *Bacillus subtilis*]. *Mol Biol (Mosk)* **24**:256-61.
176. **Mitchison, J. M.** 1970. *Methods Cell Physiol.* **4**:131-165.
177. **Mittenhuber, G.** 2001. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:1-20.
178. **Mojzita, D., and S. Hohmann.** 2006. Pdc2 coordinates expression of the *THI* regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **276**:147-61.
179. **Moore, C. M., A. Gaballa, M. Hui, R. W. Ye, and J. D. Helmann.** 2005. Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Mol Microbiol* **57**:27-40.
180. **Muhrad, D., and R. Parker.** 1999. Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* **5**:1299-307.
181. **Muller, E. H., E. J. Richards, J. Norbeck, K. L. Byrne, K. A. Karlsson, G. H. Pretorius, P. A. Meacock, A. Blomberg, and S. Hohmann.** 1999. Thiamine repression and pyruvate decarboxylase autoregulation independently control the expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PDC5 gene. *FEBS Lett* **449**:245-50.
182. **Mumberg, D., R. Müller, and M. Funk.** 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**:119-22.
183. **Müller, F., S. Ghisla, and A. Bacher.** 1988. Vitamin B2 und natürliche Flavine. Thieme, Stuttgart.
184. **Nghiêm, H. O., L. Bettendorff, and J. P. Changeux.** 2000. Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB J* **14**:543-54.
185. **Niederberger, C., H. Fankhauser, E. Edenharter, and M. E. Schweingruber.** 1996. Amiloride toxicity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is released by thiamine and mutations in the thiamine-repressible gene *car1*<sup>+</sup>. *Gene* **171**:119-22.
186. **Nishimura, H., Y. Kawasaki, Y. Kaneko, K. Nosaka, and A. Iwashima.** 1992. Cloning and characteristics of a positive regulatory gene, *THI2* (*PHO6*), of thiamin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **297**:155-8.
187. **Nishimura, H., Y. Kawasaki, Y. Kaneko, K. Nosaka, and A. Iwashima.** 1992. A positive regulatory gene, *THI3*, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**:4701-6.
188. **Nishimura, H., Y. Kawasaki, K. Nosaka, Y. Kaneko, and A. Iwashima.** 1991. A constitutive thiamine metabolism mutation, *thi80*, causing reduced thiamine pyrophosphokinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**:2716-9.
189. **Nishimura, H., K. Sempuku, and A. Iwashima.** 1982. Thiamine transport in *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. *J Bacteriol* **150**:960-2.
190. **Nosaka, K.** 1990. High affinity of acid phosphatase encoded by *PHO3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* for thiamin phosphates. *Biochim Biophys Acta* **1037**:147-54.
191. **Nosaka, K.** 2006. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:30-40.



192. **Nosaka, K., Y. Kaneko, H. Nishimura, and A. Iwashima.** 1993. Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**:17440-7.
193. **Nosaka, K., H. Nishimura, and A. Iwashima.** 1988. Identity of soluble thiamin-binding protein with thiamin-repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **967**:49-55.
194. **Nosaka, K., H. Nishimura, Y. Kawasaki, T. Tsujihara, and A. Iwashima.** 1994. Isolation and characterization of the *THI6* gene encoding a bifunctional thiamin-phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**:30510-6.
195. **Nosaka, K., M. Onozuka, H. Konno, Y. Kawasaki, H. Nishimura, M. Sano, and K. Akaji.** 2005. Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **58**:467-79.
196. **Park, J. H., P. C. Dorrestein, H. Zhai, C. Kinsland, F. W. McLafferty, and T. P. Begley.** 2003. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin pyrophosphate (vitamin B<sub>1</sub>). *Biochemistry* **42**:12430-8.
197. **Patel, D. J., A. K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R. A. Kumar, and S. Nonin.** 1997. Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J Mol Biol* **272**:645-64.
198. **Payne, S. M.** 1988. Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *Crit Rev Microbiol* **16**:81-111.
199. **Perkins, J., A. Sloma, T. Hermann, K. Theriault, E. Zachgo, T. Erdenberger, N. Hannett, N. P. Chatterjee, V. W. II, G. A. R. Jr, R. Hatch, and J. Pero.** 1999. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **22**:8-18.
200. **Peters, R.** 1936. The biochemical lesions in vitamin B1 deficiency. *Lancet*:1162-1165.
201. **Praekelt, U. M., K. L. Byrne, and P. A. Meacock.** 1994. Regulation of *THI4 (MOL1)*, a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:481-90.
202. **Prior, C., L. Tizzani, H. Fukuhara, and M. Wésolowski-Louvel.** 1996. *RAG3* gene and transcriptional regulation of the pyruvate decarboxylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* **20**:765-72.
203. **Prohl, C., W. Pelzer, K. Diekert, H. Kmita, T. Bedekovics, G. Kispal, and R. Lill.** 2001. The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix. *Mol Cell Biol* **21**:1089-97.
204. **Protchenko, O., R. Rodriguez-Suarez, R. Androphy, H. Bussey, and C. C. Philpott.** 2006. A screen for genes of heme uptake identifies the *FLC* family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **281**:21445-57.
205. **Purewal, A. S.** 1991. Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **66**:229-31.
206. **Rapala-Kozik, M., M. Olczak, K. Ostrowska, A. Starosta, and A. Kozik.** 2007. Molecular characterization of the *thi3* gene involved in thiamine biosynthesis in *Zea mays*: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. *Biochem J* **408**:149-59.
207. **Rapp, M., S. Seppala, E. Granseth, and G. von Heijne.** 2007. Emulating Membrane Protein Evolution by Rational Design. Science.
208. **Raschke, M., L. Bürkle, N. Müller, A. Nunes-Nesi, A. R. Fernie, D. Arigoni, N. Amrhein, and T. B. Fitzpatrick.** 2007. Vitamin B<sub>1</sub> biosynthesis in plants requires the essential iron sulfur cluster protein, *THIC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:19637-42.
209. **Raschke, T., N. Amrhein, and T. B. Fitzpatrick.** 2005. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **280**:32291-300.
210. **Reihl, P., and J. Stolz.** 2005. The monocarboxylate transporter homolog Mch5p catalyzes riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**:39809-17.
211. **Ribeiro, A., U. Praekelt, A. D. Akkermans, P. A. Meacock, A. van Kammen, T. Bisseling, and K. Pawlowski.** 1996. Identification of *agthi1*, whose product is involved in biosynthesis of the thiamine precursor thiazole, in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*. *Plant J* **10**:361-8.
212. **Ritsert, K., R. Huber, D. Turk, R. Ladenstein, K. Schmidt-Bäse, and A. Bacher.** 1995. Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **253**:151-67.

213. **Robbins, W. J., and M. A. Bartley.** 1937. Thiazole and the Growth of Excised Tomato Roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the ...* **23**:385-388.
214. **Rodionov, D. A., A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2002. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **277**:48949-59.
215. **Rodríguez-Navarro, S., B. Llorente, M. T. Rodríguez-Manzanque, A. Ramne, G. Uber, D. Marchesan, B. Dujon, E. Herrero, P. Sunnerhagen, and J. E. Pérez-Ortín.** 2002. Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. *Yeast* **19**:1261-76.
216. **Rosen, B. P., S. Silver, T. B. Gladysheva, G. Ji, K. L. Oden, S. Jagannathan, W. Shi, Y. Chen, and J. Wu.** 1995. The arsenite oxyanion-translocating ATPase: bioenergetics, functions and regulation. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
217. **Said, H. M.** 2004. Recent advances in carrier-mediated intestinal absorption of water-soluble vitamins. *Annu Rev Physiol* **66**:419-46.
218. **Saier, M. H.** 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:354-411.
219. **Saier, M. H., and J. Reizer.** 1992. Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* **174**:1433-8.
220. **Sambrook, J. F., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition ed. Cold Spring Harbor Press, N.Y.
221. **Santos, M. A., A. Jimenez, and J. L. Revuelta.** 2000. Molecular characterization of *FMN1*, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**:28618-24.
222. **Sauer, E., M. Merdanovic, A. P. Mortimer, G. Bringmann, and J. Reidl.** 2004. PnuC and the utilization of the nicotinamide riboside analog 3-aminopyridine in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4532-41.
223. **Schmitt, M. E., T. A. Brown, and B. L. Trumpower.** 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**:3091-2.
224. **Schröder, I., E. Johnson, and S. de Vries.** 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**:427-47.
225. **Schweingruber, A. M., J. Dlugonski, E. Edenharter, and M. E. Schweingruber.** 1991. Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport. *Curr Genet* **19**:249-54.
226. **Schweingruber, A. M., H. Fankhauser, J. Dlugonski, C. Steinmann-Loss, and M. E. Schweingruber.** 1992. Isolation and characterization of regulatory mutants from *Schizosaccharomyces pombe* involved in thiamine-regulated gene expression. *Genetics* **130**:445-9.
227. **Schweingruber, M. E., and E. Edenharter.** 1990. Thiamin regulates agglutination and zygote formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **17**:191-4.
228. **Schweingruber, M. E., R. Fluri, K. Maundrell, A. M. Schweingruber, and E. Dumermuth.** 1986. Identification and characterization of thiamin repressible acid phosphatase in yeast. *J Biol Chem* **261**:15877-82.
229. **Settembre, E., T. P. Begley, and S. E. Ealick.** 2003. Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. *Curr Opin Struct Biol* **13**:739-47.
230. **Shavlovskii, G. M., G. E. Tesliar, and L. P. Strugovshchikova.** 1982. [Flavinogenesis regulation in riboflavin-dependent *Escherichia coli* mutants]. *Mikrobiologiya* **51**:986-92.
231. **Silver, S., and L. T. Phung.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol* **50**:753-89.
232. **Singleton, C. K.** 1997. Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **199**:111-21.
233. **Sipiczki, M.** 2000. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**:REVIEWS1011.
234. **Solovieva, I. M., R. A. Kreneva, L. L. Errais, A. A. Mironov, and e. al.** 2004. Study of the Mechanism for Regulating *ribR* Gene Activity in *Bacillus subtilis*. *Russian Journal of Genetics*.
235. **Solovieva, I. M., R. A. Kreneva, L. Errais Lopes, and D. A. Perumov.** 2005. The riboflavin kinase encoding gene *ribR* of *Bacillus subtilis* is a part of a 10 kb operon, which is negatively regulated by the *yrzC* gene product. *FEMS Microbiol Lett* **243**:51-8.

236. **Solovieva, I. M., R. A. Kreneva, D. J. Leak, and D. A. Perumov.** 1999. The *ribR* gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Microbiology* (Reading, Engl) **145** (Pt 1):67-73.
237. **Spenser, I. D., and R. L. White.** 1997. Biosynthesis of Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin): An Instance of Biochemical Diversity. *Angewandte Chemie International Edition in English*.
238. **St Johnston, D.** 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**:161-70.
239. **Stahmann, K. P., J. L. Revuelta, and H. Seulberger.** 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**:509-16.
240. **Steiner-Mordoch, S., M. Soskine, D. Solomon, D. Rotem, A. Gold, M. Yechieli, Y. Adam, and S. Schuldiner.** 2007. Parallel topology of genetically fused EmrE homodimers. *EMBO J*.
241. **Stolz, J.** 2003. Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**:221-31.
242. **Stolz, J., U. Hoja, S. Meier, N. Sauer, and E. Schweizer.** 1999. Identification of the plasma membrane H<sup>+</sup>-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *J Biol Chem* **274**:18741-6.
243. **Stolz, J., and N. Sauer.** 1999. The fenpropimorph resistance gene *FEN2* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H<sup>+</sup>-pantothenate symporter. *J Biol Chem* **274**:18747-52.
244. **Stolz, J., and M. Vielreicher.** 2003. Tpn1p, the plasma membrane vitamin B<sub>6</sub> transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**:18990-6.
245. **Stolz, J., H. J. Wöhrmann, and C. Vogl.** 2005. Amiloride uptake and toxicity in fission yeast are caused by the pyridoxine transporter encoded by *bsu1<sup>+</sup>* (*car1<sup>+</sup>*). *Eukaryotic Cell* **4**:319-26.
246. **Strohmeier, M., T. Raschle, J. Mazurkiewicz, K. Rippe, I. Sinning, T. B. Fitzpatrick, and I. Tews.** 2006. Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:19284-9.
247. **Stülke, J., I. Martin-Verstraete, V. Charrier, A. Klier, J. Deutscher, and G. Rapoport.** 1995. The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* **177**:6928-36.
248. **Sudarsan, N., J. E. Barrick, and R. R. Breaker.** 2003. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* **9**:644-7.
249. **Sung, N. D., and C. Y. Lee.** 2004. Coregulation of *lux* genes and riboflavin genes in bioluminescent bacteria of *Photobacterium phosphoreum*. *J Microbiol* **42**:194-9.
250. **Suzuoki-Z.** 1955. Thiamine uptake by yeast cells. *Journal of Biochemistry* **42**:27-39.
251. **Sybesma, W., C. Burgess, M. Starrenburg, D. van Sinderen, and J. Hugenholtz.** 2004. Multivitamin production in *Lactococcus lactis* using metabolic engineering. *Metab Eng* **6**:109-15.
252. **Tanaka, K., K. Tazuya, K. Yamada, and H. Kumaoka.** 2000. Biosynthesis of thiamin under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Pharm Bull* **23**:108-11.
253. **Tang, C. S., A. Bueno, and P. Russell.** 1994. *ntf1<sup>+</sup>* encodes a 6-cysteine zinc finger-containing transcription factor that regulates the *nmt1* promoter in fission yeast. *J Biol Chem* **269**:11921-6.
254. **Thornalley, P. J., I. Jahan, and R. Ng.** 2001. Suppression of the accumulation of triosephosphates and increased formation of methylglyoxal in human red blood cells during hyperglycaemia by thiamine in vitro. *J Biochem* **129**:543-9.
255. **Titus, S. A., and R. G. Moran.** 2000. Retrovirally mediated complementation of the *glyB* phenotype. Cloning of a human gene encoding the carrier for entry of folates into mitochondria. *J Biol Chem* **275**:36811-7.
256. **Tizzani, L., P. Meacock, L. Frontali, and M. Wésolowski-Louvel.** 1998. The *RAG3* gene of *Kluyveromyces lactis* is involved in the transcriptional regulation of genes coding for enzymes implicated in pyruvate utilization and genes of the biosynthesis of thiamine pyrophosphate. *FEMS Microbiol Lett* **168**:25-30.
257. **Tommasino, M., and K. Maundrell.** 1991. Uptake of thiamine by *Schizosaccharomyces pombe* and its effect as a transcriptional regulator of thiamine-sensitive genes. *Curr Genet* **20**:63-6.
258. **Tzagoloff, A., J. Jang, D. M. Glerum, and M. Wu.** 1996. *FLX1* codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **271**:7392-7.

259. **Vallari, D. S., and C. O. Rock.** 1985. Pantothenate transport in *Escherichia coli*. J Bacteriol **162**:1156-61.
260. **van Herwaarden, A. E., E. Wagenaar, G. Merino, J. W. Jonker, H. Rosing, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel.** 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) into milk. Mol Cell Biol **27**:1247-53.
261. **van Loon, A., H. P. Hohmann, W. Bretzel, M. Humbelin, and e. al.** 1996. Devvelopment of a fermentation process for the manufacture of riboflavin. Chimia.
262. **Vander Horn, P. B., A. D. Backstrom, V. Stewart, and T. P. Begley.** 1993. Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (*thiCEFGH*) in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol **175**:982-92.
263. **Vitreschak, A. G., D. A. Rodionov, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2002. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. Nucleic Acids Res **30**:3141-51.
264. **Vitreschak, A. G., D. A. Rodionov, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2004. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? Trends Genet **20**:44-50.
265. **Vogl, C.** 2004. Versuche zur Charakterisierung von Thiamintransportproteinen in *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit. University of Regensburg, Regensburg.
266. **Vogl, C., S. Grill, O. Schilling, J. Stülke, M. Mack, and J. Stolz.** 2007. Characterization of riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol **189**:7367-75.
267. **von Heijne, G.** 1989. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. Nature **341**:456-8.
268. **Voronovsky, A. Y., C. A. Abbas, K. V. Dmytruk, O. P. Ishchuk, B. V. Kshanovska, K. A. Sybirna, C. Gaillardin, and A. A. Sibirny.** 2004. *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis. Yeast **21**:1307-16.
269. **Vorwieger, A., C. Gryczka, A. Czihal, D. Douchkov, J. Tiedemann, H. P. Mock, M. Jakoby, B. Weisshaar, I. Saalbach, and H. Bäumlein.** 2007. Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. Planta **226**:147-58.
270. **Wachter, A., M. Tunc-Ozdemir, B. C. Grove, P. J. Green, D. K. Shintani, and R. R. Breaker.** 2007. Riboswitch Control of Gene Expression in Plants by Splicing and Alternative 3' End Processing of mRNAs. Plant Cell.
271. **Wandersman, C., and P. Delepelaire.** 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu Rev Microbiol **58**:611-47.
272. **Wang, H., L. G. Ma, J. M. Li, H. Y. Zhao, and X. W. Deng.** 2001. Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. Science **294**:154-8.
273. **Wang, X., M. Bogdanov, and W. Dowhan.** 2002. Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. Embo J **21**:5673-81.
274. **Warburg, O., and W. Christian.** 1933. Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen. Biochem. Z. **266**:377-411.
275. **Warburg, O., and W. Christian.** 1932. Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum. Biochem. Z. **254**:438-458.
276. **Webb, E., K. Claas, and D. Downs.** 1998. *thiBPQ* encodes an ABC transporter required for transport of thiamine and thiamine pyrophosphate in *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem **273**:8946-50.
277. **White, P. R.** 1937. Vitamin B<sub>1</sub> in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiology **12**:803-811.
278. **Wightman, R., and P. A. Meacock.** 2003. The *THI5* gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. Microbiology (Reading, Engl) **149**:1447-60.
279. **Williams, R. J.** 1941. The Importance of Microorganisms In Vitamin Research. Science **93**:412-414.
280. **Williams, R. J., and R. R. Roehm.** 1930. The effect of the antineuritic vitamin preparations on the growth of yeasts. Journal of Biological Chemistry **87**:581-590.
281. **Williams, R. R., and T. D. Spies.** 1938. Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamine) and its Use in Medicine. The MacMillan Co., NY.
282. **Wilson, A. C., and A. B. Pardee.** 1962. Regulation of flavin synthesis by *Escherichia coli*. J Gen Microbiol **28**:283-303.

283. **Winkler, W. C., S. Cohen-Chalamish, and R. R. Breaker.** 2002. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15908-13.
284. **Worst, D. J., M. M. Gerrits, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters.** 1998. *Helicobacter pylori* *ribBA*-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *J Bacteriol* **180**:1473-9.
285. **Wu, M., B. Repetto, D. M. Glerum, and A. Tzagoloff.** 1995. Cloning and characterization of *FAD1*, the structural gene for flavin adenine dinucleotide synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**:264-71.
286. **Yang, J. W., and M. E. Schweingruber.** 1990. The structural gene coding for thiamin-repressible acid phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **18**:269-72.
287. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.
288. **Zhang, W., M. Bogdanov, J. Pi, A. J. Pittard, and W. Dowhan.** 2003. Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition. *J Biol Chem* **278**:50128-35.
289. **Zhang, Y., and T. P. Begley.** 1997. Cloning, sequencing and regulation of *thiA*, a thiamin biosynthesis gene from *Bacillus subtilis*. *Gene* **198**:73-82.
290. **Zhang, Z., M. Aboulwafa, M. H. Smith, and M. H. Saier.** 2003. The ascorbate transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:2243-50.
291. **Zhao, R., F. Gao, and I. D. Goldman.** 2002. Reduced folate carrier transports thiamine monophosphate: an alternative route for thiamine delivery into mammalian cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* **282**:C1512-7.
292. **Zhao, R., F. Gao, Y. Wang, G. A. Diaz, B. D. Gelb, and I. D. Goldman.** 2001. Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells. *J Biol Chem* **276**:1114-8.
293. **Zhu, N., B. M. Olivera, and J. R. Roth.** 1991. Activity of the nicotinamide mononucleotide transport system is regulated in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**:1311-20.
294. **Zhu, N., B. M. Olivera, and J. R. Roth.** 1989. Genetic characterization of the *pnuC* gene, which encodes a component of the nicotinamide mononucleotide transport system in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **171**:4402-9.
295. **Zurlinden, A., and M. E. Schweingruber.** 1992. Cloning and regulation of *Schizosaccharomyces pombe thi2*, a gene involved in thiamine biosynthesis. *Gene* **117**:141-3.
296. **Zurlinden, A., and M. E. Schweingruber.** 1994. Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *Schizosaccharomyces pombe thi4*, a thiamine biosynthetic gene. *J Bacteriol* **176**:6631-5.
297. **Zurlinden, A., and M. E. Schweingruber.** 1997. Identification of a DNA element in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe nmt1 (thi3)* promoter involved in thiamine-regulated gene expression. *J Bacteriol* **179**:5956-8.

## V.           Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

I. Kapitel		Seite
Abb. 1.1	Die Struktur der Flavine Riboflavin, Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD)	13
Abb. 1.2	Flavinderivate	13
Abb. 1.3	Die Organisation des <i>rib</i> Operons in <i>B. subtilis</i>	15
Abb. 1.4	Schematische Darstellung der Biosynthese von Riboflavin sowie der Coenzyme FMN und FAD in Bakterien	16
Abb. 1.5	Der Verlust von <i>ribC</i> führt zur Überproduktion von Riboflavin in <i>B. subtilis</i>	17
Abb. 1.6	Der postulierte Regulationsmechanismus durch ein RFN-Element	18
Abb. 1.7	Redoxreaktion der Flavine	21
Abb. 1.8	YpaA-Homologe	42
Abb. 1.9	YpaA ist an der Riboflavinaufnahme in <i>B. subtilis</i> beteiligt	43
Abb. 1.10	<i>ypaA</i> wird in <i>E. coli</i> exprimiert, ist aber nicht funktionell	43
Abb. 1.11	Die Phosphorylierung von Riboflavin geschieht nahezu gleichzeitig mit seiner Aufnahme	45
Abb. 1.12	Die Riboflavinaufnahme erfolgt nicht über ein Phosphotransferasesystem (PTS)	46
Abb. 1.13	Die Expression von <i>ypaA</i> wird nicht durch Eisen reguliert	47
Abb. 1.14	Die Riboflavinkonzentration im Medium reguliert sowohl die Transportaktivität von <i>B. subtilis</i> <i>AribB</i> als auch die Expression von <i>ypaA</i>	48
Abb. 1.15	Charakterisierung der Substratspezifität von YpaA	49
Abb. 1.16	Aufnahme von Riboflavinanaloga in <i>B. subtilis</i>	50
Abb. 1.17	Charakterisierung der Energieabhängigkeit des Riboflavintransports	50
Abb. 1.18	Schematische Darstellung der YpaA-Verkürzungen YpaA3, YpaA4 und YpaA5	51
Abb. 1.19	Die Membrantopologie von YpaA	52
Abb. 1.20	Sequenzanalyse von RibM	54
Abb. 1.21	Die heterologe Expression von <i>ribM</i> in riboflavinauxotrophen <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> Stämmen erlaubt Wachstum auf niedrigen Riboflavinkonzentrationen	54
Abb. 1.22	Charakterisierung der Aktivität, Energieabhängigkeit und Spezifität von RibM als Riboflavintransporter	57
Abb. 1.23	Die Ausscheidung von Riboflavin in verschiedenen <i>B. subtilis</i> Stämmen	58
Abb. 1.24	Co-Expression von <i>ribM</i> und Dodecin in <i>E. coli</i>	60
Abb. 1.25	Die Expression von Dodecin steigert die Riboflavinaufnahme in <i>E. coli</i>	61
Abb. 1.26	RibM vermittelt den Einbau von Roseoflavin in Dodecin	61
Abb. 1.27	RibM vermittelt den Einbau von [ <sup>14</sup> C]Riboflavin in Dodecin	62
Abb. 1.28	Extraktion der Chromophoren Riboflavin und Roseoflavin aus Dodecin	63
Tab. 1.1	Analyse der in Dodecin eingebauten Flavine	64

## II. Kapitel

Seite

Abb. 2.1	Die Strukturformeln von Thiamin, seiner Vorstufen HMP und HET sowie der Analoga Pyrithiamin, Oxythiamin und Amprolium	81
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Thiaminbiosynthese und der Rolle der Thiaminase II in Hefe	89
Abb. 2.3	Die Regulation der Genexpression durch TDP	94
Abb. 2.4	Das TR-Element	95
Abb. 2.5	<i>thi9</i> <sup>+</sup> komplementiert den Phänotyp von CVY4	103
Abb. 2.6	Thi9 Homologe	104
Abb. 2.7	<i>thi9</i> <sup>+</sup> kodiert für ein Plasmamembranprotein	106
Abb. 2.8	<i>ptr1</i> <sup>+</sup> ist allelisch mit <i>thi9</i> <sup>+</sup>	107
Abb. 2.9	Thi9 vermittelt Transport von Thiamin in <i>S. pombe</i>	107
Abb. 2.10	Bestimmung des <i>K<sub>m</sub></i> -Wertes von Thi9	108
Abb. 2.11	Die Thiaminaufnahme über Thi9 hängt von der Energetisierung und dem Protonengradienten ab	108
Abb. 2.12	Thi9 ist ein spezifischer Transporter für Thiamin und HET	109
Abb. 2.13	Bsu1 vermittelt den Transport von Thiamin aber nicht von Pyrithiamin	111
Abb. 2.14	Bsu1 trägt zur Thiaminaufnahme bei	111
Abb. 2.15	Putative „thiamine regulatory elements“ (TR-Elemente) im Promotorbereich von <i>thi9</i> <sup>+</sup>	112
Abb. 2.16	Thiamin reguliert die Aktivität seines Transporters	113
Abb. 2.17	Thiamin reprimiert die Transkription von <i>thi9</i> <sup>+</sup>	114
Abb. 2.18	Pyridoxin besitzt keinen reprimierenden Effekt auf die Expression von <i>thi9</i> <sup>+</sup>	114
Abb. 2.19	Der Effekt von Thiamin auf das Protein Thi9	115
Tab. 2.1	Thiaminmangel induziert die Expression bestimmter Gene in <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	93

## VI. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure/n	l	Liter
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenzgen	LB	Luria Bertani (Medium)
ATP	Adenosintriphosphat	<i>lacZ</i> / <i>LacZ</i>	β-Galaktosidase
BART	Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter Superfamilie	min	Minuten
BIO	Minimale Biotinylierungsdomäne	MeOH	Methanol
bp	Basenpaare	MTHF	Methyltetrahydrofolat
BSA	Bovine Serum Albumin	NAD(P) <sup>+</sup> /	Nicotinamidadenindinukleotid
CCCP	Carbonyl Cyanide m- Chlorophenyl-hydrazone	NAD(P)H	(phosphat), oxidiert/reduziert
CSEG	Minimalmedium für <i>B. subtilis</i>	NMN	Nicotinamidmononukleotid
DC	Dünnschichtchromatographie	NR	Nicotinamidribosid
DNA	Desoxyribonucleinsäure	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
dNTP	Desoxyribonukleotid-5- triphosphat		Matrix zur Affinitätschromato- graphie von Proteinen mit einem 6His-Tag
Em <sup>r</sup>	Erythromycinresistenzgen	OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge λ = x nm
EtOH	Ethanol	ODZ	OD Zellen (1 OD <sub>600</sub> entspricht etwa 10 <sup>9</sup> Bakterien- bzw. 10 <sup>7</sup> Hefezellen)
FAD	Flavinadenindinukleotid	ORF	Open Reading Frame
FCCP	Carbonyl Cyanide p-(tri-Fluoro- methoxy)phenylhydrazone	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FMN	Flavinadeninmononukleotid	PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>gfp</i> /GFP	Green Fluorescence Protein	<i>phoA</i> /PhoA	Alkalische Phosphatase
GTP	Guanosintriphosphat	PTS	Phosphoenolpyruvat:Zucker Phosphotransferasesystem
h	Stunde		
HA	Hämagglutinin	RoFMN	Roseoflavinmononukleotid
HET	5-(2-Hydroxyethyl)-4- methylthiazol (Thiazol)	RoFAD	Roseoflavinadenindinukleotid
His	Histidin	SDS	Sodium Dodecylsulfate
HMP	4-Amino-5-hydroxymethyl-2- methylpyrimidin (Hydroxymethyl-pyrimidin)	Std.	Stunde
IgG	Immunoglobulin G	Tc <sup>r</sup>	Tetracyclinresistenzgen
IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid	TMD	Transmembrandomäne
kDa	Kilodalton	UV	Ultraviolett
Km <sup>r</sup>	Kanamycinresistenzgen	WT	Wildtyp
		Z/ZZ	Bindedomäne des Proteins A aus <i>Staphylococcus aureus</i> , das den Fc- Teil von IgG bindet. Als Epitop wird es in zweifacher Wiederholung (ZZ) verwendet.



## VII. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Jürgen Stolz. Du hast mich während meiner Promotion, stets sehr gut betreut und immer Interesse an meiner Forschung gezeigt. Mit Deinem immensen praktischen und theoretischen Wissen hattest Du immer einen Rat parat, wenn es mal irgendwo gehakt hat. Ganz herzlich möchte ich Dir vor allem auch für die Arbeit danken, die Du investiert hast, um die Ergebnisse erfolgreich zu publizieren!

Herr Prof. Dr. W. Tanner, Ihnen danke ich, dass Sie in Besprechungen und Seminaren so ein interessierter und kritischer Zuhörer waren und bei Problemen immer gute Ratschläge und nette Worte fanden.

Was wäre das Doktorandenleben ohne Gleichgesinnte, mit denen man mal schnell am Gang oder auch mal länger im Labor über all die kleinen und großen Probleme diskutieren kann?

Allem voran danke ich Euch – Conny, Sanni und Stefan. Unser „Inkubations-Team“ war echt klasse und ich werde immer gerne an die Zeit zurück denken! Ich wünsche Euch alles Gute!

Auch bei Euch, Petra, Heike und Guido, möchte ich mich ganz herzlich bedanken! Ihr habt ebenfalls für eine sehr lockere Arbeitsatmosphäre gesorgt und auch dafür, dass jeder die empfohlene Tagesdosis Lachen bekommen hat. Denn nicht nur Vitamine sind gesund! Ich wünsche Euch alles Gute für Eure Zukunft!

Obwohl Ihr immer Euren eigenen Kaffee gekocht habt, so ward Ihr, liebe Katrin, Peter und Tanja, quasi unser Schwester-Labor! Und auch wenn ich nicht immer hätte anklopfen müssen, stand Eure Tür immer weit offen, wenn ich mal – vor allem gegen Ende meiner Doktorarbeit – den einen oder anderen Rat, seltene Enzyme, Chemikalien, etc. brauchte. Bei Euch bekam man einfach alles. Ganz herzlichen Dank dafür!

Ina, Dir danke ich, dass Du uns schon immer ab Donnerstag aufs Wochenende hast freuen lassen (obwohl Du uns manchmal auch ganz schön verwirrt hast!) und mir an diversen Samstagen an der Uni Gesellschaft geleistet hast! Und dafür hab ich Dir gerne das eine oder andere Mal geholfen, wenn der Computer oder Drucker wieder gestreikt hat.

Ein herzlicher Dank gilt auch den fleißigen Kräften, die immer im Hintergrund dafür gesorgt haben, dass das Leben am Lehrstuhl reibungslos ablief. Allem voran Vroni, Günther, Michael und Monika. Ihr habt ebenso dafür gesorgt, dass wir Doktoranden trotz aller Umbaumaßnahmen und Umzüge ungehindert weiter forschen konnten. Dir, Günther, möchte ich ganz herzlich für den traditionellen Dienstagskuchen und vor allem für die Pflege mancher Pflanze danken! Dir, Ingrid, bin ich dankbar, dass Du immer Zeit hattest, meine Medien vor dem Festwerden sowie meine SDS-Gele und Western Blots vor dem Auslaufen zu bewahren, wenn ich lieber in die Mensa ging.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Graduiertenkolleg GRK640, seinem Sprecher Prof. Dr. B. Dick und Herrn Prof. Dr. G. Hauska. Mit Ihrem Engagement haben Sie mich tatkräftig in meinem Amt als Graduiertensprecher bei der Ausarbeitung der Ringvorlesungen und der Vorbereitung der Summer Schools unterstützt. Ich bedanke mich auch sehr für die großzügige finanzielle Unterstützung durch das Kolleg. Herr Prof. P. Hegemann, Ihnen danke ich für die angeregten Roseoflavin- und Dodecin-Diskussionen, die Sie mit meinem Chef geführt haben und für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Simon Grill und Prof. Dr. M. Mack an der Hochschule Mannheim danke ich dafür, dass sie die Analyse und Quantifizierung der Chromophoren-Extrakte durchgeführt haben.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Oli, Fabian, Matthias und Prof. Dr. J. Stülke an der Georg-August-Universität in Göttingen bedanken, die mich, den Mikrobiologie-Neuling, zu Beginn meiner Doktorarbeit so nett in ihr Team aufgenommen und in die Welt von *Bacillus subtilis* eingeführt haben.

Mein Dank gilt ebenso Britta Meißner und Prof. L.-O. Essen an der Philipps-Universität Marburg, die mir ein Plasmid zur Überexpression von Dodecin zur Verfügung gestellt haben und Prof. Dr. R. Sterner, dass ich am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-2 messen durfte.

Mein allergrößter Dank gehört jedoch meinen Eltern, die mich auf jede Weise und in allen Phasen der Doktorarbeit liebevoll unterstützt und beigestanden haben. Ich danke Euch von Herzen!

## **VIII. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 11. April 2008